

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

№ 2(42)  
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.urau.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

### ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

<b>І. А. Блайда, Т. В. Васильєва</b> БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ПЕРЕРОБКИ НЕКОНДИЦІЙНИХ РУД І ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДІВ .....	6
--	---

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

<b>М. Б. Галкін, С. В. Водзінський, Л. М. Стрезєва, М. А. Джура, Б. М. Галкін, Т. О. Філіпова</b> ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ ШТАМАМИ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> З РІЗНИМ РІВНЕМ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ЦИКЛО-ДИ-ГМФ ЗА ПРИСУТНОСТІ СИНТЕТИЧНИХ АНАЛОГІВ СИГНАЛЬНОГО ХІНОЛОНУ .....	26
---	----

<b>А. Ю. Пастошук, Л. М. Сківка, Л. М. Буценко, В. П. Патица</b> ВПЛИВ ЗБУДНИКА БАЗАЛЬНОГО БАКТЕРІОЗУ НА ПРОРОСТАННЯ ЗЕРЕН ТА РІСТ ПАРОСТКІВ ПШЕНИЦІ РІЗНИХ СОРТІВ .....	39
--	----

<b>О. Ю. Зінченко, С. Л. Міресь</b> АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ МІЦЕЛІЮ ТА ЕКСТРАКТІВ ПЛОДОВИХ ТІЛ <i>GANODERMA LUCIDUM</i> (CURTIS) P. KARST. ....	49
--	----

<b>І. І. Романовська, О. В. Севастьянов, Є. А. Шестеренко, А. А. Крисько, Ю. А. Шестеренко, В. А. Топтіков</b> КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗИ ГОМОГЕНАТІВ ТРАВНИХ ЗАЛОЗ <i>RAPANA VENOSA</i> .....	60
---	----

<b>О. Г. Горшкова, Т. В. Гудзенко, О. В. Волювач, І. П. Конуп, Т. О. Беляєва</b> ОЧИЩЕННЯ ВОДИ ВІД ФЕНОЛУ ТА ЙОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ АСОЦІАЦІЄЮ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>PSEUDOMONAS</i> .....	70
---	----

<b>О. А. Грицев, О. Л. Зозуля, Н. Г. Воробйова, Л. М. Сківка</b> МОНІТОРИНГ ВИДОВОГО СКЛАДУ ГРИБІВ РОДУ <i>FUSARIUM</i> У НАСІННЄВОМУ МАТЕРІАЛІ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ .....	81
--	----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ .....	90
---	----

# CONTENTS

## OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

<b>I. A. Blayda, T. V. Vasyleva</b> BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR PROCESSING SUBSTANDARD ORES AND WASTES .....	6
---	---

## EXPERIMENTAL WORKS

<b>M. B. Galkin, S. V. Vodzinsky, L. M. Strezeva, M. A. Dzhura, B. M. Galkin T. O. Filippova</b> BIOFILM FORMATION BY <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> STRAINS WITH DIFFERENT LEVEL OF THE INTRACELLULAR C-DI-GMP IN PRESENCE OF SIGNAL QUINOLON SYNTHETIC ANALOGS .....	26
--	----

<b>A. Yu. Pastoshchuk, L. M. Skivka, L. M. Butsenko, V. P. Patyka</b> EFFECT OF CAUSAL AGENT OF BASAL BACTERIOSIS ON SEED GERMINATION AND ROOT GROWTH OF DIFFERENT WHEAT VARIETIES .....	39
---	----

<b>O. Yu. Zinchenko, S. L. Miros</b> ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF MYCELIUM AND BASIDIOCARPS OF <i>GANODERMA LUCIDUM</i> (CURTIS) P. KARST. ....	49
--	----

<b>I. I. Romanovska, O. V. Sevastyanov, Ye. A. Shesterenko, A. A. Krysko, Yu. A. Shesterenko, V. A. Toptikov</b> CARBOXYLESTERASES OF <i>RAPANA VENOSA</i> DIGESTIVE GLANDS HOMOGENATES .....	60
---	----

<b>O. G. Gorshkova, T. V. Gudzenko, O. V. Voliuvach, I. P. Konup, T. O. Belyaeva</b> PURIFICATION OF WATER FROM PHENOL AND IONS OF HEAVY METALS BY THE ASSOCIATION OF BACTERIA OF THE GENUS <i>PSEUDOMONAS</i> .....	70
---	----

<b>O. A. Hrytsev, A. L. Zozulya, N. G. Vorobieva, L. M. Skivka</b> MONITORING OF SPECIES COMPOSITION OF FUNGI OF THE GENUS <i>FUSARIUM</i> IN SEED MATERIALS OF WINTER WHEAT ON UKRAINIAN TERRITORY .....	81
--	----

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS .....	90
------------------------------------	----

**И. А. Блайда, Т. В. Васильева**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.:+38(048) 746 61 02,  
e-mail: iblayda@ukr.inet

## **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПЕРЕРАБОТКИ НЕКОНДИЦИОННЫХ РУД И ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ**

*В статье проанализирована и обобщена информация о применении биотехнологических методов для переработки минерального и техногенного сырья. Приведен обзор основных групп микроорганизмов, входящих в состав микробиоценозов различных экологических ниш и отходов. Показана лидирующая роль ацидофильных хемолитотрофных бактерий в окислении природного сульфидного сырья. Рассмотрены основные механизмы бактериального выщелачивания металлов и влияние различных факторов на эффективность окисления сульфидов металлов. Дана характеристика основным методам бактериального выщелачивания – чановому, подземному и кучному; рассмотрены их преимущества и недостатки. Приведены примеры промышленного использования биовыщелачивания для получения меди, никеля, золота, урана. Отмечено практическое отсутствие применения методов бактериального выщелачивания для переработки техногенного сырья, в частности, отходов угольной промышленности и энергетики для извлечения ценных металлов – германия, галлия и др.*

*Ключевые слова: техногенное сырье, микробиоценоз, ацидофильные хемолитотрофные бактерии, бактериальное выщелачивание, германий.*

*Введение.* Применение биотехнологических методов для переработки минерального сырья природного и техногенного происхождения с участием микроорганизмов различных физиологических групп является одним из перспективных, интенсивно развивающихся направлений. В настоящее время уже сформировалась новая научная дисциплина – биогеотехнология металлов, в рамках которой развивается отдельное направление – бактериальное выщелачивание – извлечение металлов из различного сырья под воздействием микроорганизмов или их метаболитов. Произошло это благодаря накопленным знаниям геологической микробиологии, в основе развития которой лежит тот факт, что микроорганизмы принимают активное участие в геологических процессах формирования и изменения полезных ископаемых, вплоть до деструкции природных минералов, сопровождающейся извлечением из



них полезных компонентов [2–4]. О жизнедеятельности и биохимической активности микроорганизмов в субстратах техногенного происхождения научных наблюдений сравнительно мало.

*Характеристика микроорганизмов.* Экология микроорганизмов, описанных к настоящему времени и используемых в процессах бактериального выщелачивания металлов, достаточно широка – они обнаружены как в природных условиях (вблизи серных геотермальных источников, в природных рудах и рудничных водах), так и в техногенных (в хвостохранилищах, илонакопителях, отвальных терриконах предприятий добывающей и перерабатывающей промышленности). Гетерогенные условия различных экологических ниш с перепадами температур и кислотности, специфическим физико-химическим и минералогическим составом, формируют и поддерживают широкое разнообразие аборигенной микробиоты. Обнаруженное биоразнообразие микробного населения в природных и техногенных нишах достаточно широко и представлено аэробными и анаэробными микроорганизмами, среди которых присутствуют хемолитоавтотрофные и гетеротрофные бактерии. На основании анализа и обобщения литературных данных по изучению состава микробиоценозов медных руд различных шахт Китая [34], пиритной руды (Железная Гора, Калифорния, США) [30], медно-никелевой руды месторождения Шануч (Камчатка, Россия) [10], медного концентрата Зангезурского медно-молибденового комбината (Армения) [37], золотосодержащих арсенопиритных и пиритных концентратов (Красноярский край, Россия) [13], хвостохранилищ после переработки урановой руды Ингульской шахты (Украина) [1], кислых дренажных вод с высокими концентрациями металлов [24, 25, 31, 36], ископаемого угля [29, 41], термальных источников [15, 27, 29], отходов биометаллургической переработки золото-мышьякового концентрата [7], а также имеющихся [28] и собственных исследований [18] по определению состава микробиоты породных отвалов Центральной обогатительной фабрики «Червоноградская» Львовско-Волинского угольного бассейна, золы уносов Ладьжинской и золошлака Добротворской ТЭС, составлена таблица, в которой приведены характеристики наиболее распространенных микроорганизмов, представляющих практический интерес (табл.).

Несмотря на различную природу исследуемых субстратов, их физико-химический и минералогический состав, условия формирования и существования, качественный состав их микробиоценозов во многом схож и представлен в основном ацидофильными хемолитотрофными бактериями, как мезофильными, так и умеренно термофильными. Безусловными лидерами в процессах бактериального извлечения металлов являются представители мезофильных хемолитотрофных бактерий рода *Acidithiobacillus*. Они способны использовать энергию окисления восстановленных соединений серы в серную кислоту для ассимиляции углерода, построения клеточного тела и осуществления остальных жизненных функций. Некоторые тионовые бактерии могут использовать для своей жизнедеятельности, кроме окисления серы, окисление других соединений – органических веществ или закисного железа. Умеренно термофильные бактерии, широко распространенные в микробиоценозах природных руд и техногенных субстратов и проявляющие



Таблица  
Table

Микроорганизмы, обнаруженные в геогенных и техногенных экологических нишах  
Microorganisms detected in geogenic and technogenic ecological niches

Микроорганизм	Источник выделения	Основные характеристики	Температура °С, диапазон/оптимум	pH, диапазон/оптимум	Г+П, мол. %	Источник энергии	Область применения	Ссылка
<b>Ацидофильные хемолитотрофные мезофильные бактерии</b>								
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Природные и техногенные экологические ниши с высоким содержанием серы и железа; сульфидные руды; ископаемые угли; отвалы, хвосты, шлаки и шламы после добычи и переработки первородных руд	Грамотрицательная палочка (0,2–0,4 мкм) с одним полярным жгутиком, аэроб, автотроф	5,0–40,0/ 28,0–35,0	1, 1–4,5/ 2,5	58,0–59,0	S <sup>0</sup> , Fe <sup>2+</sup> , соединения серы	Биовыщелачивание (подземное, чановое, кучное) металлов из сульфидных и смешанных руд, концентратов, некондиционного рудного и техногенного сырья (хвостов, шлаков, отвалов)	[1–4, 10, 12, 13, 18, 28, 30, 31, 34, 37]
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>		Грамотрицательная палочка (0,5–1,0 мкм) с одним полярным спиральным жгутиком, аэроб, автотроф	5,0–40,0/ 28,0–30,0	0,5–5,5/ 2,0–3,0	52,0–53,1	S <sup>0</sup> , соединения серы	То же	
<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>		Грамотрицательная палочка (0,6–1,2 мкм) подвижная, автотроф/миксотроф/факультативный анаэроб	4,0–34,0/ 28,0–37,0	1,9–3,4/ 2,5	56,0	S <sup>0</sup> , Fe <sup>2+</sup> , соединения серы	То же, десульфуризация углей	





Продолжение таблицы

<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Природные и техногенные экологические ниши с высоким содержанием железа, сульфидные руды	Грамотрицательная спиробразующая клетка (0,9–3,5 мкм), один полярный жгутик, автотроф	10,0–45,0/ 30,0–35,0	Не установлен/ 1,5–3,0	55,0–58,0	Fe <sup>2+</sup>	Биовыщелачивание (подземное, чановое, кучное) металлов из сульфидных и смешанных руд, концентратов, некондиционного рудного и техногенного сырья (хвостов, шлаков, отвалов)	[24, 36]
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>		Грамотрицательная палочка (0,3–0,6 мкм), один жгутик, автотроф	28,0–30,0/ не установлено	1,3–4,0/ 1,5–3,0	51,7	Fe <sup>2+</sup>		
<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	Природные экологические ниши с низкими значениями pH и высоким содержанием Fe <sup>2+</sup> , сульфидные минералы	Клетка неправильной формы (0,3–5,0 мкм) клеточная стенка отсутствует, автотроф	15,0–45,0/ 32,0	1,3–2,2/ 1,7	36,5	Fe <sup>2+</sup>	То же	[25]
<b>Ацидофильные хемолитотрофные умеренно термофильные бактерии</b>								
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Природные и техногенные экологические ниши с высоким содержанием серы и железа Сульфидные руды (медно-кобальтовые, свинцово-цинковые), геотермальные зоны, зоны спонтанного разгрева руд, отходы, терриконы	Грамотрицательная, палочка (0,8–1,2 мкм) с одним полярным спиралевидным жгутиком, аэроб, автотроф/миксотроф	32,0–52,0/ 45,0	1,0–3,5/ 2,0–2,3	63,1–63,9	S <sup>0</sup> , соединения серы	То же	[41]
<i>Sulfobacillus thermo sulfidoxidans</i>		Грамположительная, короткая спиробразующая палочка (0,8–3,0 мкм), аэроб, автотроф/миксотроф	20,0–60,0/ 45,0–48,8	1,5–5,5/ 2,0	48,0–50,0	S <sup>0</sup> , Fe <sup>2+</sup> , соединения серы	То же, десульфуризация углей	[7, 29]

Продолжение таблицы

<i>Sulfolobacillus acidophilus</i>			Грамположительная, короткая овальная коккоподобная споробразующая палочка (0,6–1,2 мкм), аэроб, автотроф/миксотроф	35,0–55,0/ 45,0–50,0	2,0–4,0/ 2,0	55,0–57,0	S <sup>0</sup> , Fe <sup>2+</sup> , соединения серы	Биовыщелачивание (подземное, чановое, кучное) металлов из сульфидных и смешанных руд, концентратов, некондиционного рудного и техногенного сырья (хвостов, шлаков, отвалов)	
	<i>Sulfolobacillus sibiricus</i>		Грамположительная, короткая палочка, аэроб, автотроф/миксотроф	17,0–60,0/ 55,0	1,1–3,5/ 2,2–2,5	48,0–48,2	S <sup>0</sup> , Fe <sup>2+</sup> , соединения серы	То же	
<b>Ацидофильные экстремально термофильные бактерии</b>									
<i>Aciditiamus brierleyi</i>	Геотермальные зоны, сульфидные минералы		Клетки неправильной кокковидной формы (1,0–1,5 мкм), автотроф, факультативный аэроб - в анаэробных условиях в присутствии органических веществ окисляет серу, галотолерантен	45,0–75,0/ 70,0	1,0–6,0/ 1,5–2,0	31,0	S <sup>0</sup> , Fe <sup>2+</sup> , соединения серы	Биовыщелачивание при высоких температурах	[15]
<i>Metallosphaera sedula</i>	Геотермальные зоны, вулканические поля, сульфидные минералы, в зонах с высокими		Грамположительная, кокковидная клетка (0,8–1,2 мкм), факультативный аэроб, автотроф,	55,0–80,0/ 75,0	1,0–4,5/ 2,0–3,0	46,0	S <sup>0</sup>	То же, десульфуризация углей	[27]



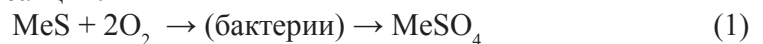
Продолжение таблицы

Гетеротрофные микроорганизмы						
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Природные и техногенные эконизи, сульфидные минералы, каменный уголь, донные отложения, сточные воды, системы очистки сточных вод	Грамотрицательная, неспорообразующая прямая или изогнутая палочка (0,5–1,5 мкм) с двумя полярными жгутиками, строгий аэроб	4,0–37,0/ 28,0–30,0	5,5–8,0/ 6,8–7,2	58,0–69,0	Сложные органические вещества белковой и углеводной природы  Восстановление ионов металлов (Fe <sup>3+</sup> до Fe <sup>2+</sup> ), перевод металлов в легучую форму, осаждение и концентрирование радионуклидов, деструкция органических веществ нефтепродуктов  [26]
<i>Bacillus poytuxa</i>	Природные и техногенные эконизи, почвы, растения, ризосфера растений, дренажные воды угольных шахт	Грамположительная, спорообразующая палочка (2,0–5,0 мкм) с перитрихальными жгутиками, аэроб, факультативный анаэроб (способен к нитратредукции)	2,0–45,0/ 25,0–30,0	5,5–9,0/ 6,8–7,2	32,0–62,0	Сложные органические вещества белковой и углеводной природы  Сорбция тяжелых металлов, восстановление марганца, очистка сточных вод, десульфурзация угля  [23, 26]
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	Природные и техногенные почвы, донные осадки, осадки сточных вод	Грамположительная крупная палочка правильной формы (1,8–5,0 мкм) с мощной слизистой капсулой, аэроб	2,0–45,0/ 28,0–30,0	6,8–7,2/ 7,0	54,5–56,8	Разрушение кремнезема и силикатов, биовыщелачивание металлов из силикатных минералов

способность к выщелачиванию металлов, относятся к роду *Sulfobacillus*. Они представляют собой уникальную группу ацидофильных бактерий, встречающуюся в сульфидных и полиметаллических рудах, термальных источниках и зонах спонтанного разогрева руд. Кроме ацидофильных хемолитотрофных в состав микробиоценозов геогенных и техногенных экологических ниш входят типичные гетеротрофные микроорганизмы – представители родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, способные восстанавливать и сорбировать металлы, разрушать сложные органические вещества – производные фенола, дибензофурен, органические красители, нефть и нефтепродукты. Некоторые представители гетеротрофных микроорганизмов участвуют в процессах обессеривания углей, разрушении кремнезема и различных силикатов.

Первоначально основное внимание в процессах бактериального выщелачивания уделяли чистым культурам, отдавая предпочтение *Acidithiobacillus ferrooxidans*, коллекционным и выделенным из аборигенных ассоциаций, адаптированным к различным условиям и субстратам [2, 21, 35]. Однако ряд исследований показывает, что смешанные культуры и консорциумы микроорганизмов более эффективны и стабильны в окислении, в частности, сульфидных минералов, чем чистые культуры [16, 38]. Так, в полупромышленных установках бактериального выщелачивания пентландита для ускорения процесса окисления минерала с целью извлечения никеля использовали симбиотическую ассоциацию ацидофильного хемолитотрофа *Acidithiobacillus ferrooxidans* и азотфиксирующего *Beijerinckia lactigones* [38]. Имеются данные о том, что окисление серы в присутствии бактерий *A. thiooxidans*, которые в ассоциациях часто встречаются вместе с *A. ferrooxidans*, протекает гораздо быстрее. Происходит это в силу существующих синтрофных отношений между микроорганизмами, и роль *A. thiooxidans* сводится к созданию благоприятных условий для роста железоокисляющих бактерий, таких как *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Leptospirillum ferrooxidans* [6].

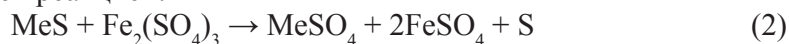
*Механизм бактериального выщелачивания.* Несмотря на многочисленные исследования и широкое применение бактериального выщелачивания металлов из сульфидных руд, механизм, лежащий в основе этого процесса, и роль, которую играют микроорганизмы при этом, до конца не выяснен. На сегодняшний день предполагают наличие как минимум трех основных механизмов: прямого, непрямого и комбинированного [6, 35, 40]. Прямое бактериальное выщелачивание происходит в несколько стадий при физическом контакте бактериальных клеток с поверхностью минерала при каталитическом воздействии ферментов, и может быть для любого сульфида металла (Me) описано следующей схемой реакции:



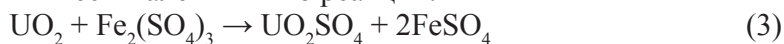
Очевидно, что при этом механизме процесса первостепенное значение играет тесный контакт бактерий с поверхностью минерала, что в свою очередь пропорционально зависит от площади поверхности и наличия дефектов кристаллической решетки. По такому механизму окисляются не содержащие железо сульфидные минералы, такие как ковеллин ( $\text{CuS}$ ), халькозин ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), сфалерит ( $\text{ZnS}$ ), галенит ( $\text{PbS}$ ), молибденит ( $\text{MoS}_2$ ), стибнит ( $\text{Sb}_2\text{S}_3$ ), кобальтин ( $\text{CoS}$ ), миллерит ( $\text{NiS}$ ) [23].



При непрямом биовыщелачивании микроорганизмам отводится только каталитическая роль при окислении в кислой среде ( $\text{pH} < 5,0$ ) двухвалентного железа до трехвалентного, которое в свою очередь уже служит непосредственным окислителем сульфидов металлов. В этом процессе принимают участие свободные, неприкрепленные к субстрату клетки, и его можно описать следующей реакцией:

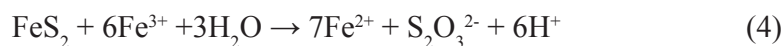


Хорошо известный пример непрямого биовыщелачивания – выделение урана из руд, заключающееся в переходе нерастворимого четырехвалентного урана в растворимый шестивалентный по реакции:

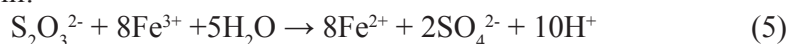


Окислителем  $\text{U}^{4+}$  выступает  $\text{Fe}^{3+}$  в виде  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , который образуется в результате жизнедеятельности бактерий *Acidithiobacillus ferrooxidans* при окислении пирита, присутствующего в урановых рудах [6, 35].

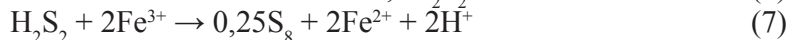
Комбинированный механизм биовыщелачивания был предложен в результате открытия внеклеточных полимерных соединений (ВПС), выделяемых микроорганизмами при прикреплении к поверхности частиц минерала, и был назван авторами «непрямой механизм через тиосульфат» применительно к нерастворимым в кислоте сульфидам и «непрямой полисульфидный механизм» применительно к растворимым в кислоте сульфидам [35]. Согласно данной концепции, как только клетка микроорганизма прикрепляется к поверхности нерастворимого в кислоте сульфида металла (пирита  $\text{FeS}_2$ , молибденита  $\text{MoS}_2$ , тангстенита  $\text{WS}_2$ ), ион  $\text{Fe}^{3+}$ , содержащийся во внеклеточном экзополимерном слое, начинает не прямое действие на сульфид металла по реакции:



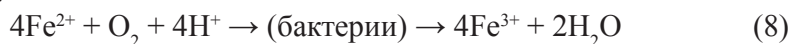
Тиосульфат является первым промежуточным продуктом, который далее через полиитионаты (тетратионат, тритионат) переходит в растворимый сульфат по реакции:



Полисульфидный механизм характерен для таких растворимых в кислотах сульфидов как сфалерит ( $\text{ZnS}$ ), халькопирит ( $\text{CuFeS}_2$ ) или галенит ( $\text{PbS}$ ), растворение которых происходит вследствие комбинированного действия  $\text{Fe}^{3+}$  и протонов по реакции:



Образующийся  $\text{Fe}^{2+}$  может быть вновь окислен до  $\text{Fe}^{3+}$ , благодаря активности *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Sulfobacillus*, присутствующих в природных ассоциациях:



В этом случае роль микроорганизмов сводится к образованию окислителя в виде  $\text{Fe}^{3+}$ .

Профессор Хельмут Трибуц (Германия) подытожил существование трех основных на сегодняшний день «стратегий» бактериального выщелачивания сульфидных минералов [40]: контактное, когда микроорганизмы прикрепляются к поверхности минерала, способствуя его электрохимическому раство-



рению с помощью  $\text{Fe}^{3+}$ , содержащегося в ВПС; не прямое, когда микроорганизмы не прикрепляются к поверхности минерала, и их действие ограничено возобновлением окислителя  $\text{Fe}^{3+}$ ; кооперативное, когда сначала окисление происходит с помощью микроорганизмов, прикрепившихся к поверхности минерала, а затем за счет  $\text{Fe}^{3+}$ , регенерируемого микроорганизмами в растворе. Однако по какому бы механизму не протекал процесс бактериально-химического выщелачивания, в результате окислительно-восстановительных реакций при непосредственном участии микроорганизмов происходит окисление сульфидов, сопровождающееся извлечением металлов в раствор.

*Технологии бактериального выщелачивания и их практическая реализация.* Несмотря на то, что начало исследованиям бактериального выщелачивания было положено еще в 1888 году открытием С.Н. Виноградским явления хемолитотрофии, первые работы по направленному использованию метода биовыщелачивания для извлечения металлов начались в 1947 году после выделения Хинкелем и Кольмером из дренажных кислых вод угольной шахты Западная Вирджиния микроорганизмов, способных окислять двухвалентное железо до трехвалентного, отнесенных к *Acidithiobacillus ferrooxidans* [22]. В настоящее время исследованиями процесса бактериального окисления и выщелачивания занимается более 100 научных организаций и фирм в 25 странах мира. Приоритет в развитии биогетехнологии металлов как целой отрасли науки принадлежит Германии, США, Франции, Китаю, Канаде. Построены и действуют десятки промышленных и опытно-промышленных установок бактериального выщелачивания в ЮАР, Австралии, Бразилии, США, Канаде, Замбии, Гане, России и других странах. В основе этих технологий лежит два разных процесса. В одном случае это перевод нерастворимых сульфидов в растворимые сульфаты или создание условий для деструкции минерала, сопровождающееся переходом металла в раствор. Примером второго процесса служит извлечение железа, мышьяка, серы и других балластных компонентов из золотоносных минералов, например, арсенопирита ( $\text{FeAsS}$ ), в результате чего оставшееся в минерале золото концентрируется в нем и далее гораздо легче извлекается традиционным цианированием. Оба этих процесса являются окислительными, но в одном случае ценный металл извлекается из минерала, и это называется «биовыщелачиванием», в другом – металл концентрируется в руде и это называется «биоокислением». В промышленной биотехнологии оба эти процесса относят к биовыщелачиванию, отличительной особенностью которого является возможность извлечения металлов из «бедных» руд, руд сложного состава, руд с тонкой вкрапленностью редких металлов, а также из хвостов и отвалов горно-обогачительных предприятий и других некондиционных источников. Основное внимание уделяется сульфидным и комплексным (медным, медно-никелевым, урановым, золотосодержащим и др.) минералам и промпродуктам их переработки, как наиболее изученным и востребованным. Так, в США более 15% меди и значительное количество урана добывается методами бактериального выщелачивания. При этом биовыщелачивание меди из природных забалансовых руд с содержанием 0,1–0,3% металла обходится в 2–5 раз дешевле, чем традиционная пирометаллургическая обработка.



Основные технологические приемы проведения бактериального выщелачивания сводятся к организации чанового (периодического или непрерывного), кучного или подземного процессов. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. Чановое биовыщелачивание (перколяционное или пачуковое в зависимости от организации контакта твердой и жидкой фаз), в отличие от кучного и подземного, это наиболее контролируемый процесс, который обеспечивает высокую степень и скорость извлечения металлов (рис. 1). Возможность осуществления постоянного контроля основных параметров процесса дают возможность поддерживать количество бактерий на постоянном физиологически активном уровне, контролировать селекцию и доминирование наиболее адаптированных и продуктивных бактерий [5, 8].



**Рис. 1. Чановая установка биоокисления для предобработки золотоносных минералов рудника Fairview (Южная Африка)**

**Fig. 1. Leaching plant for preprocessing of gold minerals from Fairview Mine (South Africa)**

Технология чанового выщелачивания с использованием ацидофильных хемолитотрофных бактерий в опытном масштабе успешно применена к отходам руды уранового месторождения Форстау, Австрия (содержат  $0,03 \div 0,15\%$  урана) [20]; низкосортной урановой руде шахты Турамдих, Индия ( $0,03\%$  по  $U_3O_8$ ) [33]; обедненной урановой руде шахты Сагханд, Иран [14]; руде Ингульской шахты, Украина ( $10^{-3} \div 10^{-1}\%$  урана) [1]. В промышленном масштабе наиболее широко чановое биоокисление используют для удаления железа и мышьяка из золотоносных руд, главным образом из-за минимального (контролируемого) экологического воздействия на окружающую среду и ряда других преимуществ. В настоящее время в Китае, Австралии, Уганде и США функционируют около десяти промышленных установок непрерывного чанового биоокисления, работающих по так называемой технологии ВАСОХ, разработанной канадской фирмой VasTech. В ЮАР, Бразилии, Австралии, Филиппинах, Гане, Перу, Казахстане, Китае и Узбекистане работает около 15 чановых установок по технологии ВІОХ компании Gencor, направленных на

предварительную переработку упорных руд и концентратов перед традиционным извлечением золота путем выщелачивания цианированием. С помощью этих технологий удалось повысить извлечение золота из огнеупорной руды с 40 до 90% [32].

Процессы кучного и подземного выщелачивания, в том числе и бактериального, приобретают особое значение при добыче металлов из руд непосредственно в местах залегания (на глубине в отработанных шахтах), из забалансовых руд и бедных месторождений. Эти технологические приемы требуют длительного времени – от 1 до 3 лет, поскольку осуществляются в природных неконтролируемых условиях, в широком диапазоне температур, редокс потенциала и рН, при различной интенсивности ирригации (орошения), аэрации и доступности питательных веществ (рис. 2). Кучное бактериальное выщелачивание в коммерческих целях впервые было реализовано в 1958 году на медном руднике Bingham Canyon (штат Юта, США) для извлечения меди из некондиционных руд. В настоящее время кучное биовыщелачивание широко применяется для извлечения меди из вторичных медных руд, содержащих минералы халькопирит ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) и ковеллин ( $\text{CuS}$ ). Впоследствии, начиная с 1980-х годов, многочисленные установки кучного биовыщелачивания меди были введены в эксплуатацию во многих странах мира, и в конце прошлого века мировое производство меди методом биовыщелачивания достигло 25%. Вслед за медью этот процесс был запущен на урановом руднике Elliot Lake Mine (Онтарио, Канада) для получения урана. В последние годы значительно возросло внимание к кучному бактериальному выщелачиванию с точки зрения подготовки упорного золотосодержащего сырья к цианированию. В результате биоокисления извлечение золота увеличивается до 50,0% по сравнению с 25,7% при прямом цианировании. Проводится много исследований и укрупненных испытаний, однако до практической промышленной реализации дело еще не дошло.



**Рис. 2.** Кучное бактериальное выщелачивание меди из некондиционных руд медного рудника Bingham Canyon (штат Юта, США)

**Fig. 2.** Heap leaching copper from substandard ores of copper mine Bingham Canyon (Utah, United States)



В Казахстане, Узбекистане, Армении и России активно развиваются технологии бактериального выщелачивания, в основном урана, золота, меди и никеля, в силу наличия мощной сырьевой базы этих металлов и развитой структуры горнодобывающих и перерабатывающих предприятий, работающих по традиционным химическим технологиям. Казахстанскими учеными АО «Центр наук о Земле, металлургии и обогащения» разработана технология биохимического извлечения золота из упорных руд месторождений Акбакай, Васильковское и Бестобе, обеспечивающая повышение извлечения ценного металла на 15,0–20,0% по сравнению с классической цианидной переработкой. Еще одна разработанная биотехнология обогащения лежалых хвостов Прибалхашской и Акбакайской обогатительных фабрик позволяет получать кондиционные золотосодержащие концентраты с содержанием благородного металла 25,0–30,0 г/т при его извлечении до 70,0%, которые могут далее идти на переработку цианированием [11]. Другая казахстанская компания «BioGeoТес» провела испытания по бактериальному окислению арсенопиритного концентрата на месторождении Бестобе, в результате чего произошло снижение содержания мышьяка в концентрате с 11,0 до 1,1%, а выход золота при последующем цианировании составил 95,0% [42]. Все перечисленные работы проводятся в укрупненном масштабе, подтверждают высокую эффективность и перспективность биотехнологического подхода и находятся на стадии дальнейшего промышленного внедрения.

В Украине есть все необходимые предпосылки для развития и внедрения бактериального выщелачивания, как минимум, урана и золота, по наиболее отработанным и распространенным на сегодняшний день в мировой практике технологиям, описанным выше. Это связано с наличием мощной сырьевой базы урана (по ресурсам и запасам урана Украина входит в первую десятку стран мира и занимает ведущее место в Европе), а также высокому золоторудному потенциалу, который не оценивался должным образом и не представлял государственного интереса, пока Украина входила в состав СССР. Тем не менее, несмотря на перспективность биотехнологических методов, имеются отдельные отрывочные сведения о разработках украинских ученых в этом направлении. Так, в КОУкрГГРИ (Крымское отделение Украинского государственного геологоразведочного института, Симферополь) в 2005–2010 гг. была разработана комплексная биотехнология переработки различных типов золотосодержащих руд, продуктов их обогащения и отходов. Несмотря на широкий диапазон содержания золота в исследуемом сырье (1,3–420 г/т), биореагент извлекал его в раствор на 68–96%. При биоокислении и последующем выщелачивании из высокомышьяковистого сульфидного концентрата (27% As) степень извлечения золота достигала 93,2% против 54,0% при прямом цианировании. Были проведены лабораторные, пилотные и укрупненные испытания разработанной технологии на золотосодержащих рудах месторождений Украины, Китая, России и Греции [9]. На сегодняшний день судьба разработки неизвестна.

*Заключение.* Несмотря на то, что процессы добычи и переработки геогенного и техногенного сырья с участием микроорганизмов уже заняли прочную позицию в мировой практике, они способны конкурировать на сегодня с



традиционными технологиями только в отраслях цветной металлургии, связанных с добычей и переработкой сульфидного (медного, уранового, цинкового, никелевого, золотосодержащего) сырья. В литературе отсутствуют данные о разработках биотехнологических подходов к переработке перспективного техногенного сырья, в частности, для извлечения редких металлов – отходов добычи, обогащения и сжигания ископаемых углей. Что касается сведений о возможности целенаправленного или попутного получения редких металлов бактериальным выщелачиванием, то они весьма ограничены и сводятся к известной работе профессора Agrad E. Torma [39], в которой он приводит данные о выщелачивании с помощью *Thiobacillus ferrooxidans* германия и галлия из побочных продуктов переработки алюминия, цинка и меди, в частности, сульфидных минералов - сфалерита и халькопирита, причем с весьма низкими показателями по извлечению редких металлов (до 20%).

В Биотехнологическом научно-учебном центре Одесского национального университета имени И. И. Мечникова на протяжении ряда лет проводятся научно-исследовательские работы по разработке и апробации бактериального выщелачивания редких металлов – германия, галлия, циркония и др. – из промышленных отходов, в частности, обогащения и сжигания углей [17–19]. Установлено наличие в микробиоценозе отходов обогащения и переработки угля представителей гетеротрофных и ацидофильных хемолитотрофных бактерий, в частности мезофильных и умеренно термофильных АХБ родов *Acidithiobacillus* и *Sulfobacillus*, нейтрофильных тионовых и сульфатредуцирующих бактерий. В гетеротрофной составляющей обнаружено присутствие "силикатных" бактерий, способных разрушать кремнезем и устойчивые силикатные структуры. Выделенные чистые культуры микроорганизмов, идентифицированные как *Acidithiobacillus ferrooxidans*, проявили хорошие технологические и биологические свойства (активность, скорость роста, резистентность, способность к адаптации и др.) и послужили основой унифицированного бактериального препарата для биовыщелачивания германия из бедных субстратов, в частности, техногенного происхождения. Извлечение германия в процессе чанового биовыщелачивания при установленных оптимальных условиях и использовании питательной среды рассчитанного оптимального состава превышает 90%. Разработанная биотехнология переработки породных отвалов обогащения каменного угля с получением германиевого концентрата защищена Патентами Украины и показала свою высокую эффективность при укрупненных испытаниях в условиях действующего предприятия ТЭК Украины.



**І. А. Блайда, Т. В. Васильєва**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38(048) 746 61 02,  
e-mail: iblayda@ukr.net

## **БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ПЕРЕРОБКИ НЕКОНДИЦІЙНИХ РУД І ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДІВ**

### **Реферат**

*У статті проаналізована та узагальнена інформація про застосування біотехнологічних методів для переробки мінеральної і техногенної сировини. Наведено огляд основних груп мікроорганізмів, що входять до складу мікробіоценозів різних екологічних ніш і відходів. Показана провідна роль ацидофільних хемолітотрофних бактерій в окисненні природної сульфідної сировини. Розглянуто основні механізми бактеріального вищогоування металів і вплив різних чинників на ефективність окиснення сульфідів металів. Описано характеристику основних методів бактеріального вищогоування – чанового, підземного і купчастого; розглянуто їх переваги та недоліки. Наведені приклади промислового використання біовищогоування для отримання міді, нікелю, золота, урану. Відзначена практично відсутність застосування методів бактеріального вищогоування для переробки техногенної сировини, зокрема, відходів вугільної промисловості та енергетики для вилучення цінних металів – германію, галію та ін.*

*Ключові слова: техногенна сировина, мікробіоценоз, ацидофільні хемолітотрофні бактерії, бактеріальне вищогоування, германій.*

**I. A. Blayda, T. V. Vasyleva**

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska St.,  
Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 746 51 02,  
e-mail: iblayda@ukr.net

## **BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR PROCESSING SUBSTANDARD ORES AND WASTES**

### **Summary**

*The information about using of biotechnological methods for the processing of mineral and technogenic raw materials was analyzed and summarized in the article. A review of the main groups of microorganisms that make up the microbiocenosis of various ecological niches and wastes is given. The leading role of acidophilic chemolithotrophic bacteria in the oxidation process of natural sulphide raw materials is also shown. Basic mechanisms of bacterial leaching of metals and the influence of various factors on the efficiency of oxidation of sulfides are considered. A characteristic of the main methods of bacterial leaching – tanks, underground and heap was given and there were considered their advantages and disadvantages. The article gives the world examples of the use of bioleaching for the production of copper, nickel, gold, uranium. It is noted that there is no practical application of bacterial leaching for processing technogenic raw materials, in*



*particular; coal and energy industry waste for the extraction of valuable metals – germanium, gallium, etc.*

*Key words: technogenic raw materials, microbiocenosis, acidophilic chemolithotrophic bacteria, bacterial leaching, germanium*

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Дербасова Н. М., Гавриш М. В., Смирнов С. Б.* Бактериальное выщелачивание урана из отходов уранодобывающей промышленности // Ядерна та радіаційна безпека. – 2011. – 2, № 50. – С. 52–55.
2. *Заварзин Г. А.* Литотрофные микроорганизмы. – М.: Наука, 1972. – 254 с.
3. *Иванов М. В., Каравайко Г. И.* Геологическая микробиология // Микробиология. – 2004. – 73, № 5. – С. 581–597.
4. *Каравайко Г. И., Кузнецов С. И., Голомзик А. И.* Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. – М.: Наука, 1972. – 248 с.
5. *Каравайко Г. И., Росси Дж., Агате А. и др.* Биотехнология металлов. Практическое руководство. – М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1989. – 375 с.
6. *Кузякина Т. И., Хайнасова Т. С., Левенец О. О.* Биотехнология извлечения металлов из сульфидных руд // Вестник КРАУНЦ. Науки о Земле. – 2008. – 2, № 12. – С. 76–86.
7. *Меламуд В. С., Пивоварова Т. А., Турова Т. П.* *Sulfobacillus sibiricus* sp. nov. новая умеренно термофильная бактерия // Микробиология. – 2003. – 72, № 5. – С. 681–688.
8. *Полькин С. И., Адамов Э. В., Панин В. В.* Биоготехнология металлов. – М.: Недра, 1985. – 243 с.
9. *Сидякина Г. Г., Носальская Т. В., Смирнова О. М.* Экологически чистая биотехнология обогащения золотосодержащих руд техногенных отходов. // Мат. Крым. отд. Укр. госуд.Геологоразведоч. ин-та, Украина, Симферополь, 2010. – С. 18–42.
10. *Трухин Ю. П., Хайнасова Т. С., Рогатых С. В.* Выделение хемолитотрофных микроорганизмов из окисленной руды медно-никелевого месторождения Шануч (Камчатка) для биовыщелачивания сульфидных руд // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2012. – 1, № 2. – С. 83–92.
11. *Черняк А. С., Сафронов А. Ю., Кашевский А. В.* Биотехнология и бионеорганическая химия благородных металлов: состояние и перспективы // Матер. науч-практ. конф. «Химия и хим. технология на рубеже тысячелетий» (Томск, март 2000): Томск: Изд-во ТПУ, 2000. – Т. 1. – С. 169–172.
12. *Черняк А. С.* Основы биотехнологии металлов. – Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 2002. – 102 с.
13. *Шкетова А. Н., Селезнев А. Н.* Применение биоготехнологии при извлечении золота из сульфидных углистых руд // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2014. – 1, № 6. – С. 34–42.
14. *Abdollahy Mahmoud, Shojaosadati Sayed Abbas, Zare Tavakoli Hasan, Valivand Ali.* Bioleaching of Low Grade Uranium Ore of Saghand Mine // Research Note. – 2011. – 30, № 4. – P. 71–79.



15. *Andreas Seeger, Annemarie Neuner, Jakob K. Kristjansson, Karl O. Stetter. Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov. and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: Facultatively Aerobic, Extremely Acidophilic Thermophilic Sulfur-Metabolizing Archaeobacteria // International Union of Microbiological Societies. – 1986. – 36, № 4. – P. 559–564.

16. *Baker B. J., Banfield J. F.* Microbial communities in acid mine drainage // FEMS Microbiol. Ecol. – 2003. – 44. – P. 139–152.

17. *Blayda I., Vasyleva T., Slysarenko L., Abisheva Z., Ivanytsia V.* The germanium extraction from industrial wastes by microbiological methods // XXVI International Mineral Processing Congress (IMPC 2012). – New Delhi, India – 2012. – P. 550–558.

18. *Blayda I., Vasyleva T., Baranov V., Slysarenko L., Shulyakova S., Brodiazhenko T.* Composition of Aboriginal Consortium of Microorganisms from Coal Mines Dumps // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2017 – 11, № 2. – С. 67–78.

19. *Blayda I. A., Vasylieva N. Yu., Vasylieva T. V., Sliusarenko L. I.* Variance Analysis for Optimization of the Germanium Bioleaching Process from Coal Beneficiation Dumps // Biotechnologia Acta. – 2017. – 10, № 4. – P. 44–52.

20. *Bosecker K., Wirth G.* Bacterial Leaching of a Carbonate Bearing Uranium Ore // Biogeochemistry of Ancient and Modern Environments. – 1979. – P. 577–582.

21. *Bosecker K.* Bioleaching: metal solubilization by microorganisms // FEMS Microbiol. Rev. – 1997. – 20. – P. 591–604.

22. *Colmer A. R., Hinkle M. E.* The role of microorganisms in acid mine drainage: A preliminary report // Science. – 1947. – 106. – P. 253–256.

23. *El-Midany A., Abdel-Khalek M.A.* Reducing sulfur and ash from coal using *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus polymyxa* // Fuel. – 2014. – 115. – P. 589–595.

24. *Giaveno A., Lavallo L., Chiacchiarini P., Donati E.* Bioleaching of zinc from low-grade complex sulfide ores in an airlift by isolated *Leptospirillum ferrooxidans* // Hydrometallurgy. – 2007. – 89. – P. 117–126.

25. *Golyshina O., Timmis K.* Ferroplasma and relatives, recently discovered cell wall lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal rich environments // Environ. Microbiol. – 2005. – 7, № 9. – P. 1277–1288.

26. *Karavaiko G. I., Lobyreva L. B.* An overview of the bacteria and archaea involved in removal of inorganic and organic sulfur compounds from coal // Fuel Process Technol. – 1994. – 40. – P. 167–182.

27. *Kathryne S. Auernik, Robert M. Kelly.* Physiological Versatility of the Extremely Thermoacidophilic Archaeon *Metallosphaera sedula* Supported by Transcriptomic Analysis of Heterotrophic, Autotrophic, and Mixotrophic Growth // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – 76, № 3. – P. 931–935.

28. *Kuzmishyna S., Hnatush S., Moroz O., Karpinets L., Baranov V.* Microbiota of Chervonograd Mining Region // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2014. – № 67. – С. 234–242.

29. *Norris P. R., Clark D. A., Owen J. P., Waterhouse S.* Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus*, sp. nov., and other moderately thermophilic mineral-



- sulphide-oxidizing bacteria // *Microbiology (UK)*. – 1996. – 142, № 4. – P. 775–783.
30. Philip L. Bond, Greg K. Druschel, Jillian F. Banfield. Comparison of Acid Mine Drainage Microbial Communities in Physically and Distinct Ecosystems // *Appl. Environ Microbiol.* – 2000. – 66, № 11. – P. 4962–4971.
31. Pinar Aytar, Catherine M. Kay, Mehmet Burcin Mutlu, Ahmet Cabuk. Coal Desulfurization with *Acidithiobacillus ferrivorans* from Balya Acidic Mine Drainage // *Energy Fuels*. – 2013. – 27, № 6. – P. 3090–3098.
32. Olson G. J., Brierley J. A., Brierley C. L. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – 63. – P. 249–257.
33. Pal S., Pradhan D., Das T., Sukla L. B., Roy G. Chaudhury. Bioleaching of low-grade uranium ore using *Acidithiobacillus ferrooxidans* // *Indian J. Microbiol.* – 2010. – 50, № 1. – P. 70–75.
34. Qiu Guan-zhou, Liu Xue-duan, Zhou Hong-bo. Microbial community structure and function in sulfide ore bioleaching systems // *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*. – 2008. – № 18. – P. 1295–1301.
35. Sand W., Gehrke T., Jozsa P.-G., Schippers A. (Bio) chemistry of bacterial leaching – direct vs indirect bioleaching // *Hydrometallurgy*. – 2001. – 59. – P. 159–175.
36. Shuang Mi, Jian Song, Jianqun Lin, Yuanyuan Che, Huajun Zheng, Jianqiang Lin. Complete Genome of *Leptospirillum ferriphilum* ML-04 Provides Insight into Its Physiology and Environmental Adaptation // *The Microbiological Society of Korea*. – 2011 – 49, № 6. – P. 890–901.
37. Stepanyan S. Kh., Vardanyan A. K, Vardanyan N. S. Biooxidation of pyrite, sulfide ore and copper concentrate by new isolated sulfur and/or iron oxidizing bacteria // *Biolog. Journal of Armenia*. – 2016. – 68, № 1. – P. 6–10.
38. Torma A. E. The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical processes // *Advances in Biochemical Engineering*. – 1977. – 6. – P. 1–37.
39. Torma Arpad E. The Microbiological Extraction of Less Common Metals. Overview // *JOM*. – 1989. – P. 32–35.
40. Tributsch H. Direct vs indirect bioleaching // *Hydrometallurgy*. – 2001. – 59. – P. 177–185.
41. Zhou Qiu Guan, Bo Fu, Hong Bo Zhou et al. Isolation of a strain of *Acidithiobacillus caldus* and its role in bioleaching of chalcopyrite // *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. – 2007. – 23, № 9. – P. 1217–1225.
42. Отраслевой портал горно-металлургической промышленности «Metal Mining info» <http://metalmininginfo.kz/archives/3224>

## References

1. Derbasova NM, Gavrish MV, Smirnov SB. Bakterialnoe vyischelachivanie urana iz othodov uranodobyivayushey promyshlennosti. Yaderna ta radiatsiyna bezpeka. 2011;2(50):52-55 (in Russian)
2. Zavarzin GA. Litotrofnyie mikroorganizmyi, Nauka, Moskva, 1972:254.
3. Ivanov MV, Karavayko GI. Geologicheskaya mikrobiologiya. Mikrobiologiya. 2004; 73(5):581–597 (in Russian)



4. *Karavayko GI, Kuznetsov SI, Golomzik AI.* Rol mikroorganizmov v vyischelachivanii metallov iz rud. Nauka, Moskva, 1972:248 (in Russian)

5. *Karavayko GI, Rossi J., Agate A.* Biogetehnologiya metallov. Prakticheskoe rukovodstvo. Tsentr mezhdunarodnykh proektov Gosudarstvennogo komiteta po nauke i tehnike. Moskva. 1989:375 (in Russian)

6. *Kuzyakina TI, Hainasova TS, Levenez OO.* Bitehnologiya izvlecheniya metallov iz sulfidnykh rud. Vestnik KRAUNTS. Nauki o Zemle. 2008;2(12):76-86 (in Russian)

7. *Melamud VS, Pivovarova TA, Turova TP.* *Sulfobacillus sibiricus* sp. nov. novaya umerenno termofilnaya bakteriya. Mikrobiologiya.2003;(72(5)):681-688.

8. *Polkin SI, Adamov EV, Panin VV.* Biogetehnologiya metallov. Nedra. Moskva, 1985:243 (in Russian)

9. *Sidyakina GG, Nosalskaya TV, Smirnova OM.* Ekologicheskii chistaya biotehnologiya obogascheniya zolotosoderzhaschikh rud tehnogennykh othodov. In: Materialy Krymskogo otdeleniya Ukrainskogo gosudarstvennogo Geologorazvedochnogo institute. Simferopol.2010:18-42 (in Russian)

10. *Trukhin YuP., Haynasova TS, Rogatykh SV.* Vydelenie hemolitotrofnikh mikroorganizmov iz okislennoy rudy medno-nikelevogo mestorozhdeniya Shanuch (Kamchatka) dlya biovyischelachivaniya sulfidnykh rud. Izvestiya vuzov. Prikladnaya himiya i biotehnologiya. 2012;1(2):83-92 (in Russian)

11. *Chernyak AS, Safronov AYu., Kashevsky AV.* Biotehnologiya i bioneorganicheskaya himiya blagorodnykh metallov: sostoyanie i prespektivy In: Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Himiya i him. tehnologiya na rubezhe tyisyacheletiy». Tomsk.2000;(1):169-172 (in Russian)

12. *Chernyak AS.* Osnovy biotehnologii metallov. Izdatelstvo Irkutskogo universiteta. Irkutsk. 2002:102 (in Russian)

13. *Shketova LE, Seleznev AN.* Primenenie biogetehnologii pri izvlechenii zolota iz sulfidnykh uglistykh rud. Izvestiya vuzov. Prikladnaya himiya i biotehnologiya.2014;1(6):34-42 (in Russian)

14. *Abdollahy Mahmoud, Shojaosadati Sayed Abbas, Zare Tavakoli Hasan, Valivand Ali.* Bioleaching of Low Grade Uranium Ore of Saghand Mine. Research Note. 2011;30(4):71-79.

15. *Andreas Segerer, Annemarie Neuner, Jakob K. Kristjansson, Karl O. Stetter.* *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov. and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: Facultatively Aerobic, Extremely Acidophilic Thermophilic Sulfur-Metabolizing Archaeobacteria. International Union of Microbiological Societies.1986;36(4):559-564.

16. *Baker BJ, Banfield JF.* Microbial communities in acid mine drainage. // FEMS Microbiol. Ecol. – 2003. – Vol. 44. – P. 139 – 152.

17. *Blayda I, Vasyleva T, Slysarenko L, Abisheva Z, Ivanytsia V.* The germanium extraction from industrial wastes by microbiological methods. In: XXVI International Mineral Processing Congress (IMPC 2012). New Delhi, India. 2012:550-558.

18. *Blayda I, Vasyleva T, Baranov V, Slysarenko L, Shulyakova S, Brodiazhenko T.* Composition of Aboriginal Consortium of Microorganisms from Coal Mines Dumps. Biologichni Studiyi.2017;11(2):67– 78.



19. *Blayda IA., Vasylieva NYu., Vasylieva TV., Sliusarenko LI.* Variance Analysis for Optimization of the Germanium Bioleaching Process from Coal Beneficiation Dumps. *Biotechnologia Acta.* 2017;10(4):44-52.
20. *Bosecker K, Wirth G.* Bacterial Leaching of a Carbonate Bearing Uranium Ore. *Biogeochemistry of Ancient and Modern Environments.* 1979:577-582.
21. *Bosecker K.* Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 1997;(20):591-604.
22. *Colmer AR, Hinkle ME.* The role of microorganisms in acid mine drainage: A preliminary report. *Science.* 1947;(106):253–256.
23. *El-Midany A, Abdel-Khalek MA.* Reducing sulfur and ash from coal using *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus polymyxa*. *Fuel.* 2014;(115):589–595.
24. *Giaveno A, Lavallo L, Chiacchiarini P, Donati E.* Bioleaching of zinc from low-grade complex sulfide ores in an airlift by isolated *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy.* 2007;(89):117-126.
25. *Golyshina O, Timmis K.* Ferroplasma and relatives, recently discovered cell wall lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal rich environments. *Environ. Microbiol.* 2005;(7(9)):1277-1288.
26. *Karavaiko GI, Lobyreva LB.* An overview of the bacteria and archaea involved in removal of inorganic and organic sulfur compounds from coal. *Fuel Process Technol.* 1994;(40):167–182.
27. *Kathryne S. Auernik, Robert M. Kelly.* Physiological Versatility of the Extremely Thermoacidophilic Archaeon *Metallosphaera sedula* Supported by Transcriptomic Analysis of Heterotrophic, Autotrophic, and Mixotrophic. *Applied and Environmental Microbiology.* 2010;76(3):931-935.
28. *Kuzmishyna S, Hnatysh S, Moroz O, Karpinets L, Baranov V.* Microbiota of Chervonograd Mining Region. *Visn. Lviv. Un-ty. Ser. Boil.* 2014;67:234-242.
29. *Norris PR, Clark DA, Owen JP, Waterhouse S.* Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus*, sp. nov., and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology (UK).* 1996;(142):775-783.
30. *Philip L. Bond, Greg K. Druschel, and Jillian F. Banfield.* Comparison of Acid Mine Drainage Microbial Communities in Physically and Distinct Ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(11): 4962–4971.
31. *Pinar Aytar, Catherine M. Kay, Mehmet Burcin Mutlu, Ahmet Cabuk.* Coal Desulfurization with *Acidithiobacillus ferrivorans* from Balya Acidic Mine Drainage. *Energy Fuels.* 2013;27 (6):3090–3098.
32. *Olson GJ, Brierley JA, Brierley CL.* Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003;(63):249–257.
33. *Pal S, Pradhan D, Das T, Sukla LB, Roy G.* Chaudhury. Bioleaching of low-grade uranium ore using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Indian J. Microbiol.* 2010;50(1):70–75.
34. *Qiu Guan-zhou, Liu Xue-duan, Zhou Hong-bo.* Microbial community structure and function in sulfide ore bioleaching systems. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* 2008;(18):1295-1301.
35. *Sand W, Gehrke T, Jozsa PG, Schippers A.* (Bio) chemistry of bacterial leaching – direct vs indirect bioleaching. *Hydrometallurgy.* 2001;(59):159–175.





36. *Shuang Mi, Jian Song, Jianqun Lin, Yuanyuan Che, Huajun Zheng, Jianqiang Lin*. Complete Genome of *Leptospirillum ferriphilum* ML-04 Provides Insight into Its Physiology and Environmental Adaptation . The Microbiological Society of Korea. 2011;49(6):890-901.
37. *Stepanyan SKh, Vardanyan AK, Vardanyan, NS*. Biooxidation of pyrite, sulfide ore and copper concentrate by new isolated sulfur and/or iron oxidizing bacteria. Biolog. Journal of Armenia. 2016;(68(1)):6-10.
38. *Torma AE*. The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical processes. Advances in Biochemical Engineering. 1977;(6):1–37.
39. *Torma Arpad E*. The Microbiological Extraction of Less Common Metals. Overview. JOM. 1989:32-35.
40. *Tributsch H*. Direct vs indirect bioleaching. Hydrometallurgy. 2001;(59):177-185.
41. *Zhou Qiu Guan, Bo Fu, Hong Bo Zhou et al*. Isolation of a strain of *Acidithiobacillus caldus* and its role in bioleaching of chalcopyrite. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 2007;23(9):1217-1225.
42. Otralevoy portal gorno-metallurgicheskoy promyishlennosti «Metal Mining info» <http://metalmininginfo.kz/archives/3224>

Стаття надійшла до редакції 03.05.2018 р.



**М. Б. Галкін, С. В. Водзінський, Л. М. Стрезєва,  
М. А. Джура, Б. М. Галкін, Т. О. Філіпова**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 57 61,  
тел.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: kgalkin@onu.edu.ua

**ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ ШТАМАМИ  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* З РІЗНИМ РІВНЕМ  
ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ЦИКЛО-ДИ-ГМФ  
ЗА ПРИСУТНОСТІ СИНТЕТИЧНИХ  
АНАЛОГІВ СИГНАЛЬНОГО ХІНОЛОНУ**

**Мета роботи** – дослідження формування біоплівки клітинами *Pseudomonas aeruginosa* з різним внутрішньоклітинним рівнем цикло-ди-ГМФ за впливу оригінальних похідних 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону з різною довжиною алкільного ланцюга. **Методи.** Клітини тест штамів інкубували у 96-лункових планшетах за присутності 20, 40 та 80 мкМ досліджуваних сполук. Сполуки були поділені на дві групи – зі зменшеною відносно PQS довжиною алкільного ланцюга та зі збільшеною відносно PQS довжиною алкільного ланцюга. Вміст планктонних клітин визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 600 нм. Формування біоплівки оцінювали за допомогою CV-тесту (crystal violet-тесту) спектрофотометрично за довжини хвилі 592 нм. **Результати.** Отримані результати показали що аналоги PQS зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга, у більшості випадків помірно знижують вміст планктонних клітин, тоді як похідні зі збільшеною довжиною алкільного ланцюга більш суттєво впливають на цей показник. PQS і його синтетичні аналоги підвищували масу біоплівок *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 на 34–79% та 135–217%, відповідно. У разі штаму *P. aeruginosa* PA01 ΔwspF1 досліджувані сполуки чинили протилежну дію – знижували масу біоплівок порівняно з контролем в 1,4–2 рази. **Висновки.** Встановлено, що PQS та його похідні з різною довжиною алкільного замісника модулюють процес формування біоплівки *P. aeruginosa* залежно від внутрішньоклітинного вмісту цикло-ди-ГМФ: стимулюють у штамів з природним і зниженим рівнями, але пригнічують його у разі високого вмісту вторинного месенджера..

**Ключові слова:** PQS, синтетичні аналоги PQS, циклічний 3,5-дигуанозин-монофосфат (цикло-ди-ГМФ), *Pseudomonas aeruginosa*



Однією з ключових систем мікробної клітини, що впливає на всі аспекти її існування є система міжклітинної комунікації – *quorum sensing* (QS). Система QS забезпечує координовану експресію численних індукційних генів за рахунок використання малих сигнальних молекул, синтез яких залежить від щільності клітин у популяції [7]. Під контролем системи QS знаходиться дуже багато ознак, таких як формування біоплівки, синтез вторинних метаболітів і численних факторів патогенності [15, 16]. Все це робить систему QS перспективною мішенню для пошуку інструментів її регуляції, як з точки зору підвищення синтезу біотехнологічно корисних продуктів, так і з точки зору пошуку нових антимікробних препаратів.

Однією з найбільш вивчених є система QS у *Pseudomonas aeruginosa*. Вона побудована за принципом аутоіндукції та складається з трьох пов'язаних між собою ланок – *las*-, *rhl*- та *pqs*-, в кожній з яких використовується своя сигнальна молекула [6, 8]. Перші дві ланки регулюються ацильованими гомосерин лактонами, що є сигнальними молекулами більшості грамнегативних бактерій [7]. Третя ланка регулюється унікальною сигнальною сполукою – 2-гептил-3-гідроксі-4-хінолоном, що носить назву PQS (**P**seudomonas **Q**uinolon **S**ignal) [14]. Ця молекула грає величезну роль у функціонуванні клітин *P. aeruginosa*, регулюючи роботу всіх ланок системи QS [6], синтез вторинних метаболітів, таких як рамноліпіди та феназинові пігменти [4], та, навіть, використовується як зброя у конкурентній боротьбі з іншими видами мікроорганізмів [12]. У зв'язку з цим, сьогодні *pqs*-ланка розглядається як потенційна мішень сполук-модуляторів системи QS *P. aeruginosa*. Серед цих сполук, важливе місце мають займати синтетичні аналоги 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону з різними замісниками [11]. Процес утворення біоплівки контролюється також важливим вторинним месенджером бактерій – циклічним-3,5-дигуанозинмонофосфатом (цикло-ди-ГМФ) [9].

З огляду на вищенаведене, метою даної роботи було дослідження формування біоплівки клітинами *P. aeruginosa* з різним внутрішньоклітинним рівнем цикло-ди-ГМФ за впливу оригінальних похідних 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону з різною довжиною алкільного ланцюга.

### Матеріали та методи

У роботі було досліджено синтетичні похідні 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону з різною довжиною алкільного ланцюга. Сполуки були синтезовані в Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І. І. Мечникова за методикою [10]. Структурні формули досліджених сполук наведені у табл.

В роботі використано штам дикого типу *P. aeruginosa* PA01 з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова і штами *P. aeruginosa* з низьким (PA01 pJN2133) та підвищеним (PA01 ΔwspF1) рівнями циклічного дигуанозинмонофосфату, люб'язно надані О. Ржепішевською з університету м. Умео, Швеція. Штами культивували на м'ясо-пептоному агарі при 37 °С та зберігали при 4 °С.

Усі експерименти проводили на рідкому середовищі LB (г/л): пептон – 15,0, дріжджовий екстракт – 10,0, хлорид натрію – 5,0.



Таблиця

Структурні формули та хімічні назви похідних 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону, використаних у дослідженні

Table

Structure formula and chemical names of 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon derivatives, used in this study

Назва сполуки	Структурна формула
2-пропіл-3-гідрокси-4-хінолон, C3Q	
2-ізопропіл-3-гідрокси-4-хінолон, iC3Q	
2-пентил-3-гідрокси-4-хінолон C5Q	
2-гептил-гідрокси-4-хінолон, PQS	
2-октил-3-гідрокси-4-хінолон, C8Q	
2-ноніл-3-гідрокси-4-хінолон, C9Q	
2-ундодеканоіл-3-гідрокси-4-хінолон, C11Q	

Визначення маси біоплівки та кількості планктонних клітин проводили за культивування у 96-лункових плоскодонних планшетах Nuclon. У дослідні лунки додавали по 4 мкл розчинів досліджуваних сполук у диметилсульфоксиді (ДМСО) до кінцевих концентрацій 20, 40 та 80 мкМ; 20 мкл суспензій клітин тест-штамів *P. aeruginosa* ( $10^3$  КУО/мл) та 180 мкл середовища LB. У контрольні лунки замість сполук додавали 4 мкл ДМСО. Планшети інкубували при 37 °С впродовж 24 годин.



Кількість клітин у планктоні оцінювали спектрофотометрично за довжині хвилі 600 нм.

Після ретельного відмивання лунок планшетів від неприкріплених клітин біоплівки фіксували 96% етанолом впродовж 10 хв, висушували і забарвлювали 1% розчином кристалічного фіолетового. Через 15 хв барвник видаляли, лунки промивали і після висушування додавали по 200 мкл лізувального розчину, що містив 0,1 М NaOH і 1% додецилсульфату натрію. Оптичну густану вимірювали за довжини хвилі 592 нм [3].

Вимірювання здійснювали на приладі SmartSpec Plus (Bio-Rad, Hungary).

Усі експерименти проводили у 3-х незалежних дослідах з 8 повторами у кожному. Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного аналізу. Розраховували середні значення показників ( $\bar{X}$ ) та їх стандартну помилку ( $S\bar{X}$ ). Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ( $p \leq 0,05$ ). Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel [2].

### Результати та їх обговорення

Використані у роботі штами *P. aeruginosa* з низьким (PA01 pJN2133) і з високим (PA01  $\Delta$ wspF1) порівняно з батьківським штамом вмістом цикло-ди-ГМФ були сконструйовані у лабораторії Caroline S. Harwood [5]. Рівень цикло-ди-ГМФ у клітинах залежить від активності двох специфічних ензимів – дигуанілатсинтази (WspR) та цикло-дигуанілат фосфодіестерази (протеїн PA2133). Виснаження рівня вторинного месенджера у *P. aeruginosa* pJN2133 досягається за рахунок додаткових копій гена PA2133, введених в клітини у складі плазмиди pJN105 (пустий вектор). Підвищенню рівня цикло-ди-ГМФ у *P. aeruginosa*  $\Delta$ wspF1 сприяє мутація в гені *wspF*, продукт якого є негативним регулятором дигуанілатсинтази.

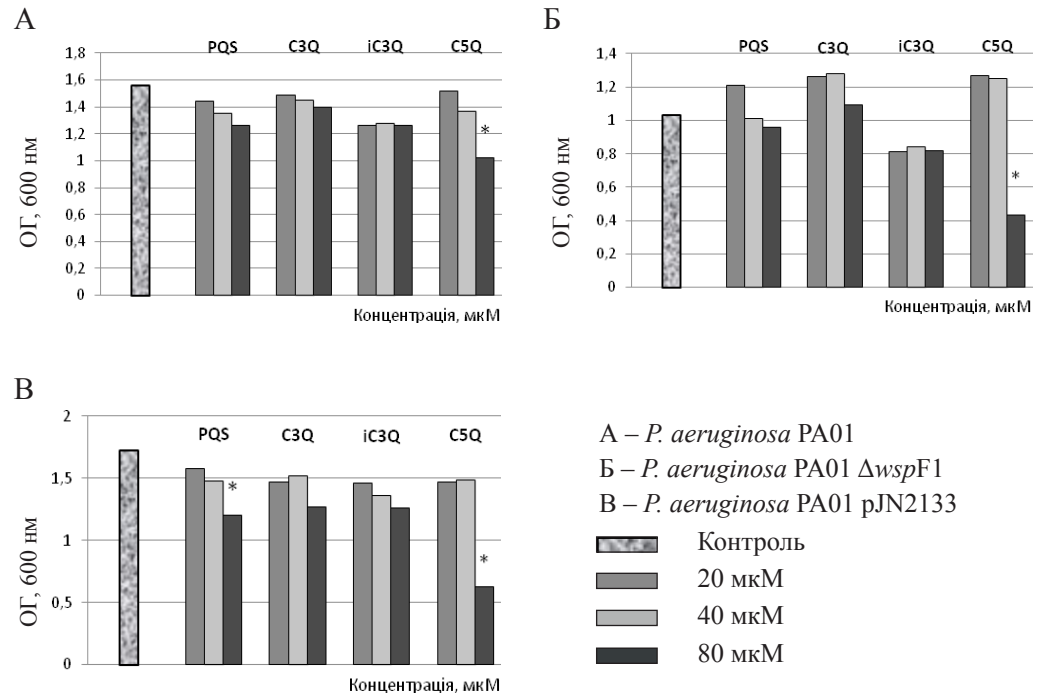
Дослідження впливу PQS на вміст планктонних клітин використаних тест-штамів (рис. 1 А-В) показало, що ця сполука дещо знижує їх кількість у штамів з середнім та зменшеним внутрішньоклітинним рівнем цикло-ди-ГМФ. Так, за присутності 80 мкМ PQS кількість клітин у планктоні *P. aeruginosa* PA01 становила 80%, а у планктоні *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 – 69% від контролю.

У той же час, у разі *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1 характер дії сигнального хінолону відрізнявся від двох інших штамів (рис. 1Б). За присутності 20 мкМ PQS спостерігалася невелике – на 17%, зростання кількості планктонних клітин, тоді як за двох інших концентрацій дані не відрізнялися від контролю.

Синтетичні аналоги PQS зі зменшеним числом атомів вуглецю в ацильному заміснику в цілому виявляли тотожну сигнальному хінолону дію. До відмінностей слід віднести більш значний пригнічувальний вплив сполуки C5Q у концентрації 80 мкМ. Кількість планктонних клітин *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1 і *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 достовірно знижувалася у 1,5, 2,5 та 2,7 рази, відповідно. Сполука iC3Q чинила однакову дію на штами PA01 і PA01  $\Delta$ wspF1 за усіх досліджених концентрацій. Крім того,



на відміну від PQS, C3Q і C5Q, цей аналог у концентраціях 20 і 40 мкМ не підвищував кількості клітин *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1 у планктоні (рис. 1Б).



**Рис. 1.** Вплив PQS та його синтетичних аналогів зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга на вміст планктонних клітин тест-штамів *P. aeruginosa*  
Примітка: \* – різниця достовірна у порівнянні з контролем

**Fig. 1.** Effect of PQS and its synthetic analogs with short alkyl chain action on *P. aeruginosa* test-strains planktonic cells content

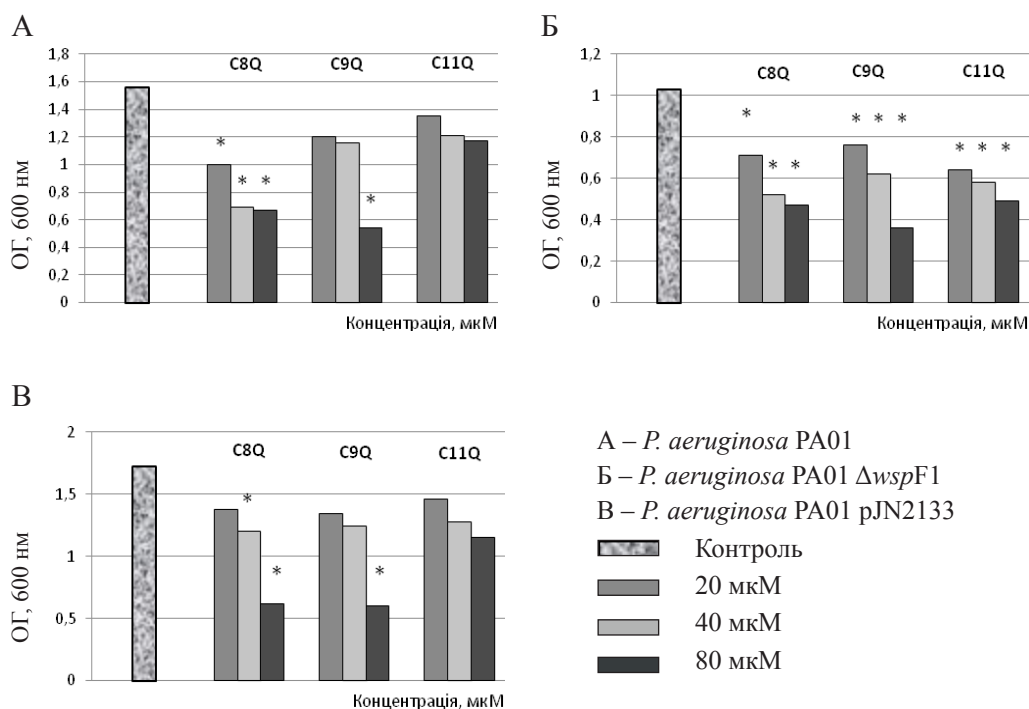
Note: \* – the differences were significant in comparison with control

Дані щодо активності похідних з більшою ніж у PQS довжиною алкільного ланцюга наведені на рис. 2.

Встановлено, що усі три сполуки цієї групи – C8Q, C9Q, C11Q, дозозалежним чином зменшували вміст планктонних клітин всіх досліджених штамів *P. aeruginosa*. Найбільшу активність виявили сполуки C8Q і C9Q, які переважали дію як самого PQS так і його аналогів зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга. Особливо суттєві відмінності у порівнянні з контролем та ефектами сигнального хінолону спостерігалися при концентрації 80 мкМ. Встановлено, що усі три сполуки цієї групи – C8Q, C9Q, C11Q, дозозалежним чином зменшували вміст планктонних клітин всіх досліджуваних штамів *P. aeruginosa*. Найбільшу активність виявили сполуки C8Q і C9Q, які переважали дію як самого PQS так і його аналогів зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга. Особливо суттєві відмінності у порівнянні з контролем та ефектами сигнального хінолону спостерігалися при концентрації 80 мкМ. Так, C8Q знижував проти контролю кількість клітин у планктоні в 2,3; 2,2



та 2,8 рази у штамів *P. aeruginosa* PA01, PA01  $\Delta$ wspF1 та PA01 pJN2133, відповідно. При порівнянні з PQS зареєстровано дворазове зменшення кількості планктонних клітин за дії цієї сполуки. 2-Ноніл-3-гідрокси-4-хінолон (C9Q) чинив на досліджувані штами таку саму дію, що і C8Q, з деякими незначними кількісними відмінностями. *P. aeruginosa* PA01 та PA01 pJN2133 виявилися менш чутливими до дії C11Q (рис. 1 А і В). Хоча вплив цієї сполуки на *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1 був таким самим, що C8Q і C9Q (рис. 1 Б).



**Рис. 2. Вплив синтетичних аналогів PQS зі збільшеною довжиною алкільного ланцюга на вміст планктонних клітин тест-штамів *P. aeruginosa***  
 Примітка: \* – різниця достовірна у порівнянні з контролем

**Fig. 2. Effect of synthetic analogs of PQS with long alkyl chain action on *P. aeruginosa* test-strains planktonic cells content**

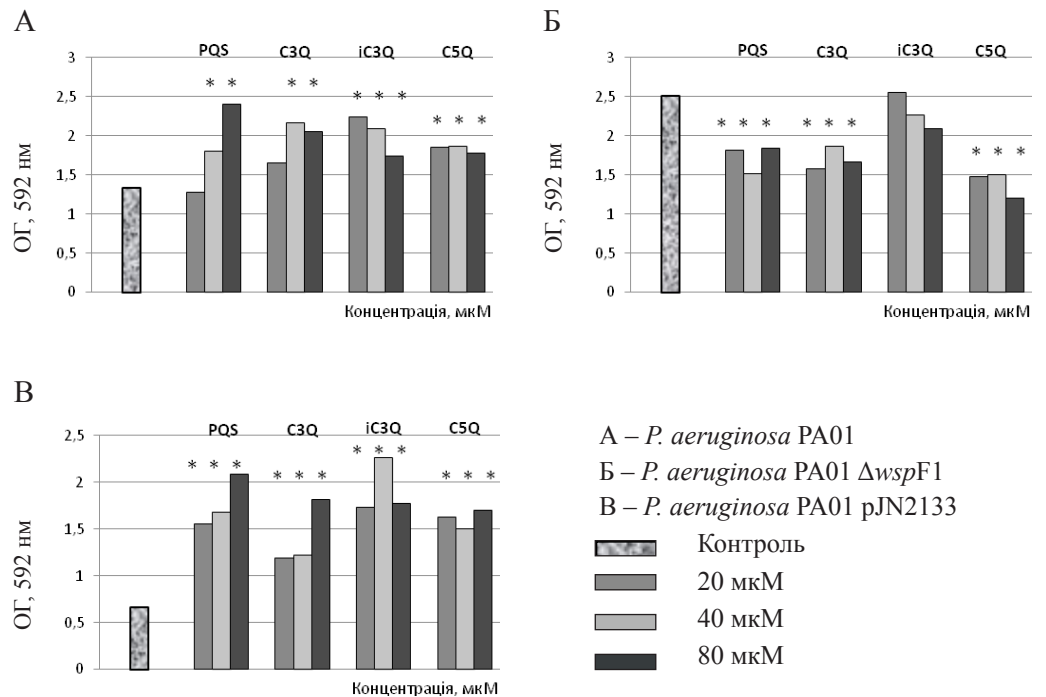
Note: \* – the differences were significant in comparison with control

За масою утвореної біоплівки досліджувані штами, як було показано нами раніше [1], розміщуються таким чином: *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 < *P. aeruginosa* PA01 < *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1. За результатами даного дослідження відмінності у кількісних значеннях цього показника між штамами становлять 1,9–3,8 рази. При цьому найбільша різниця спостерігається між штамами з низьким (PA01 pJN2133) та підвищеним (*P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1) вмістом внутрішньоклітинного цикло-ди-ГМФ.

Результати дослідження впливу сигнального хінолону та його синтетичних аналогів представлені на рис. 3 і 4.

Встановлено, що на відміну від односпрямованого характеру дії дослід-

жуваних сполук на вміст планктонних клітин усіх штамів *P. aeruginosa*, вони протилежним чином впливають на утворення біоплівки різними штамами. PQS і його аналоги стимулюють цей процес у штамів *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 та пригнічують його у *P. aeruginosa* PA01  $\Delta wspF1$ . Як видно на рис. 3 А і В, PQS пропорційно концентрації підвищує масу біоплівки *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 на 34–79% та 135–217%, відповідно.



**Рис. 3.** Вплив PQS та його синтетичних аналогів зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга на формування біоплівки тест-штамами *P. aeruginosa*  
 Примітка: \* – різниця достовірна у порівнянні з контролем

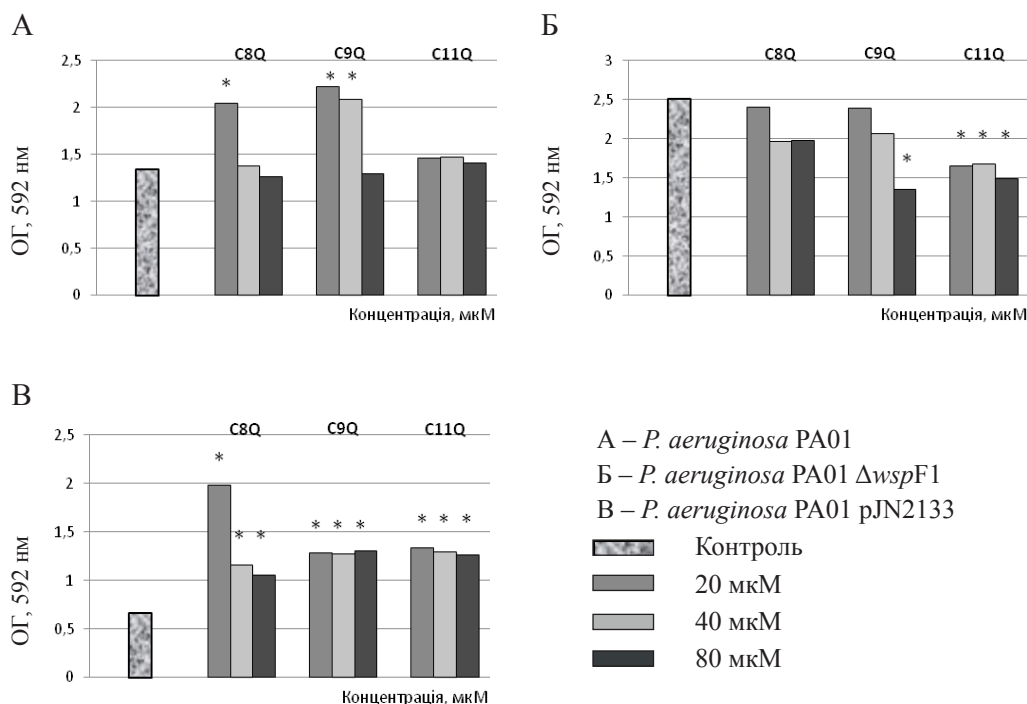
**Fig. 3.** Effect of PQS and its synthetic analogs with short alkyl chain action on *P. aeruginosa* test-strains biofilm formation  
 Note: \* – the differences were significant in comparison with control

Подібні зміни формування біоплівки цими штамами *P. aeruginosa* викликали і похідні C3Q, iC3Q та C5Q. При цьому слід зазначити, що PQS і його аналоги ефективніше стимулювали даний процес на тлі низького вмісту цикло-ди-ГМФ у штаму *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. У разі штаму *P. aeruginosa* PA01  $\Delta wspF1$  досліджувані сполуки чинили протилежну дію. За їх присутності маса біоплівки порівняно з контролем була нижчою в 1,4–2 рази.

Такий самий характер змін маси біоплівки спостерігався і за впливу аналогів сигнального хінолону зі збільшеною довжиною алкільного замісника (рис. 4).







**Рис. 4.** Вплив синтетичних аналогів PQS зі збільшеною довжиною алкільного ланцюга на формування біоплівки тест-штамами *P. aeruginosa*

Примітка: \* – різниця достовірна у порівнянні з контролем

**Fig. 4.** Effect of synthetic analogs of PQS with long alkyl chain action on *P. aeruginosa* test-strains biofilm formation

Note: \* – the differences were significant in comparison with control

Однак, сполука С8Q виявляла найбільшу стимулювальну дію у концентрації 20 мкМ (штами PA01 і PA01 pJN2133). Підвищення концентрації або відміняло цей ефект (*P. aeruginosa* PA01), або суттєво його знижувало (*P. aeruginosa* PA01 pJN2133). Синтетичний аналог С9Q у концентраціях 20 та 40 мкМ на 65% підвищував масу біоплівки *P. aeruginosa* PA01, але не змінював її у концентрації 80 мкМ (рис. 4А). У разі *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 С9Q викликав однакове за усіх концентрацій зростання маси біоплівки – у 1,93 рази (рис. 4А). Такий самий якісний і кількісний вплив на біоплівку даного штаму здійснювала сполука С11Q.

Синтетичні аналоги PQS зі збільшеною довжиною алкільного ланцюга, як і сполуки С3Q, іС3Q та С5Q, протилежним чином впливали на формування біоплівки *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1 (рис. 4Б). Маса біоплівок була меншою за контрольне значення в усіх варіантах. Максимальні ефекти були зареєстровані за 80 мкМ С9Q – зменшення на 47%, та за усіх концентрацій С11Q – на 37%.

Ґрунтуючись на отриманих результатах можна констатувати, що здатність PQS та його похідних модулювати процес формування біоплівки у *P. aeruginosa* залежить від внутрішньоклітинного вмісту цикло-ди-ГМФ. З медичної точки зору представляє інтерес пригнічувальна дія аналогів сиг-

нального хінолону на штам *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1, клітини якого характеризуються високим рівнем циклічного дигуанозинмонофосфата. Оскільки клітини будь-яких бактерій у складі біоплівки (що спостерігається при інфекціях) мають підвищений рівень цього вторинного месенджера [13] можна припустити перспективність створення на основі досліджених аналогів PQS нових антимікробних засобів з антибіоплівковими властивостями. До найбільш привабливих слід віднести сполуки C5Q і C11Q. Здатність PQS і його аналогів зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга стимулювати утворення біоплівки штамом *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 на тлі низького вмісту цикло-ди-ГМФ може бути використана для підвищення синтезу корисних речовин у біоплівкових реакторах.

Стимуляція дослідженими сполуками формування біоплівки *P. aeruginosa* PA01, клітини якого мають «нормальний», проміжний між двома іншими штамми, рівень цикло-ди-ГМФ, свідчить про їх модульовальний вплив на систему *quorum sensing* і, перш за все, на її *qqs*-ланку. Одержані результати також викликають цікаве запитання – чи можуть PQS та його синтетичні аналоги впливати на систему обміну цикло-ди-ГМФ? Порівняння їх впливу на штам *P. aeruginosa* з різними рівнями вторинного месенджера створює враження, що ці молекули можуть повертати вміст цикло-ди-ГМФ до концентрацій, характерних для батьківського штаму дикого типу. З'ясуванню такої можливості будуть присвячені подальші дослідження.

**Н. Б. Галкін, С. В. Водзінський, Л. М. Стрезєва,  
М. А. Джура, Б. М. Галкін, Т. О. Филиппова**  
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,  
тел.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: kgalkin@onu.edu.ua

## **ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЁНКИ ШТАММАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ЦИКЛО-ДИ-ГМФ В ПРИСУТСТВИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ СИГНАЛЬНОГО ХИНОЛОНА**

### **Реферат**

**Цель работы.** Изучение формирования биопленки клетками *Pseudomonas aeruginosa* с различным внутриклеточным уровнем циклического-3,5 дигуанозинмонофосфата (цикло-ди-ГМФ) в присутствии оригинальных производных 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолона с разной длиной алкильной цепи.

**Методы.** Клетки тест штаммов инкубировали в 96-луночных планшетах в присутствии 20, 40 и 80 мкм исследуемых соединений. Соединения были разделены на две группы – с уменьшенной относительно PQS длиной алкильной цепи и с увеличенной относительно PQS длиной алкильной цепи. Рост планктонной культуры определяли спектрофотометрически при длине волны 600 нм. Формирование биопленки оценивали с помощью CV-теста (crystal violet-теста) спектрофотометрически при длине волны 592 нм.

**Результаты.** Полученные результаты показали, что аналоги PQS с умень-



шенной длиной алкильной цепи в большинстве случаев умеренно снижали содержание планктонных клеток, тогда как производные с увеличенной длиной алкильной цепи более существенно влияли на этот показатель. PQS и его синтетические аналоги увеличивали массу биопленок *P. aeruginosa* PA01 и *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 на 34–79% и 135–217%, соответственно. В случае штамма *P. aeruginosa* PA01 ΔwspF1 изучаемые соединения оказывали противоположное действие – снижали массу биопленок по сравнению с контролем в 1,4–2 раза. **Выводы.** Показано, что PQS и его производные с разной длиной алкильной цепи модулируют процесс формирования биопленки *P. aeruginosa* в зависимости от внутриклеточного содержания цикло-ди-ГМФ: стимулируют у штаммов с естественным и сниженным уровнями, но угнетают его в случае высокого содержания вторичного мессенджера.

**Ключевые слова:** PQS, синтетические аналоги PQS, циклический 3,5-дигуанозинмонофосфат (цикло-ди-ГМФ), *Pseudomonas aeruginosa*.

**M. B. Galkin, S. V. Vodzinsky, L. M. Strezeva,  
M. A. Dzhura, B. M. Galkin T. O. Filippova**  
Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska St.,  
Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 33 61,  
e-mail: kgalkin@onu.edu.ua

## BIOFILM FORMATION BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS WITH DIFFERENT LEVEL OF THE INTRACELLULAR C-DI-GMP IN PRESENCE OF SIGNAL QUINOLON SYNTHETIC ANALOGS

### Summary

**Aim.** Study of the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* cells with different level of intracellular cyclic-3,5-diguanosinmonophosphate (c-di-GMP) in presence of original derivatives of 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon with different length of alkyl chain. **Methods.** Test strain cells were incubated in 96-well plates in presence 20, 40 and 80 μM of discovered compounds. The compounds were divided in to two groups – with shorter length of alkyl chain then in PQS, and with longer length of alkyl chain then in PQS. Planktonic culture growth was determined spectrophotometricly on the wave length 600 nm. Biofilm formation was studded by CV-test (crystal violet-test) spectrophotometricly on the wave length 592 nm. **Results.** The obtained results showed that PQS analogs with shorter length of alkyl chain in most cases slightly decrease planktonic cells content. In the other hand, the derivatives with longer length of alkyl chain showed more sufficient effects on planktonic culture content. PQS and its synthetic analogs increased biofilm mass of *P. aeruginosa* PA01 and *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 on 34–79% and 135–217%, respectively. In the case of *P. aeruginosa* PA01 ΔwspF1 the discovered compounds showed opposite effect – the decreased biofilm mass in 1.4–2 times compare to the control. **Conclusions.** It has been shown that PQS and its synthetic derivatives with different alkyl chain length modulate biofilm formation process in *P. aeruginosa* depending on intracellular level of c-di-GMP: stimulate in the strains with natural and decreased amount but inhibit in the case of high amount of this secondary messenger.



*Key words: PQS, PQS synthetic analogs, cyclic 3.5-diguanosinemonophosphate (cyclic-di-GMP), Pseudomonas. aeruginosa.*

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Галкін М. Б., Семенець А. С., Фіногенова М. О., Галкін Б. М., Філіпова Т. О. Утворення біоплівки та рухливість бактерій *Pseudomonas aeruginosa* з різними рівнями вмісту циклічного дигуанозинмонофосфату // Мікробіологія і біотехнологія – 2017. – № 2. – С. 40–50.
2. Ланач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морин-он.– 2001. – 260 с.
3. Christensen G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices // J. clin. microbiol. 1985. –V. 22, № 6. – P. 996–1006.
4. Dietrich L.E.P., Price-Whelan A., Petersen A., et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the *quorum sensing* network of *Pseudomonas aeruginosa* // Molecular Microbiology. – 2006. – V. 61. – P. 1308–1320
5. Hickman J. W., Tifrea D. F., Harwood C. S. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels // PNAS. – 2005. – V. 102. – P. 14422–14427.
6. McKnight S. L., Iglewski B H., Pesci E C. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* // Journal of Bacteriology. – 2000. – V. 182. – P. 2702–2708.
7. Ng W. L., Bassler B. L. Bacterial *quorum-sensing* network architectures // Annu. Rev. Genet. – 2009. – V. 43. – P. 197–222.
8. Pesci E. C., Iglewski B. H. The chain of command in *Pseudomonas aeruginosa* *quorum sensing* // Trends Microbiol. – 1997. – Vol. 5. – P. 132–134.
9. Römling U., Gomelsky M., Galperin M. Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. // Molecular Microbiology. – 2005. – V. 57, № 3. – P. 629–639.
10. Somanathan R., Smith K. M. Synthesis of some 2-alkyl-4-quinolone and 2-alkyl-4-methoxyquinoline alkaloids // J. heterocycl. Chem. – 1981. – V. 18. – № 6. – P. 1077–1079.
11. Soukariéh F. , Oton E. V., Dubern J-F, et al. In Silico and in Vitro-Guided Identification of Inhibitors of Alkylquinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // Molecules – 2018. – V. 23. – P. 257–272.
12. Szamosvári D., Böttcher T. 4-Quinolone N-oxides as bacterial weapons // Synlett. – 2018. – V. 29. – 542–547.
13. Valentini M., Filloux A. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria // J. Biol. Chem. – 2016. – V. 291, № 24. – P. 12547–12555.
14. Welch M., Hodgkinson J. T., Gross J., et al. Ligand binding kinetics of the *quorum sensing* regulator PqsR // Biochemistry. – 2013. – V. 52. – P. 4433–4438.
15. Winson M. K., Camara M., Layifi A., et al. Multiple N-acyl-L-homoserine



lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa* (autoinducers/quorum sensing/gene regulation) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – V. 92. – P. 9427–9431.

16. Winzer K., Williams P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria // Int. J. Med. Microbiol. – 2001. – V. 291. – P. 131–143.

### References

1. Galkin MB, Semenets AS, Finogenova MO, Galkin BM, Filipova TO. Biofilm formation and motility of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* with different c-di-GMP level. Microbiology and Biotechnology. 2017;38(2):40–50. (in Ukrainian) doi: 10.18524/2307-4663.2017.2(38)/105020

2. Lapach CN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metodi v medikobiologicheskikh issledovaniyach s ispolsovaniem Excel. – K.: Morion. – 2001. – 260p. (in Russian)

3. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. J. clin. microbiol. 1985;22(6):996–1006

4. Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A, et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 2006;6:1308–1320. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x

5. Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. PNAS.2005;102:14422–14427. doi: 10.1073/pnas.0507170102

6. McKnight S L, Iglewski BH, Pesci EC. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact.2000;182:2702–2708.

7. Ng WL, Bassler B. Bacterial quorum-sensing network architectures. Annu. Rev. Genet.2009;43:197–222. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134304

8. Pesci EC, Iglewski BH. The chain of command in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. Trends Microbiol.1997;5:132-134. doi: 10.1016/S0966-842X(97)01008-1

9. Römling U, Gomelsky M, Galperin MY. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. Mol. Microbiol. 2005;57(3):629-639. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x

10. Somanathan R, Smith KM. Synthesis of some 2-alkyl-4-quinolone and 2-alkyl-4-methoxyquinoline alkaloids J. heterocycl. Chem. 1981;18(6):1077-1079. doi: 10.1002/jhet.5570180603

11. Soukariéh F, Oton EV, Dubern J-F, et al. In Silico and in Vitro-Guided Identification of Inhibitors of Alkylquinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Molecules. 2018;23:257-272. doi: 10.3390/molecules23020257

12. Szamosvári D, Böttcher T. 4-Quinolone N-oxides as bacterial weapons. Synlett. 2018;29:542–547.



13. Valentini M, Filloux A. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. J. Biol. Chem. – 2016;291:12547–12555.
14. Welch M, Hodgkinson JT, Gross J, et al. Ligand binding kinetics of the quorum sensing regulator PqsR. Biochemistry. 2013;52:4433–4438. doi: 10.1021/bi400315s
15. Winson MK, Camara M, Layifi A, et al. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa* (autoinducers/quorum sensing/gene regulation). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995;92:9427-9431.
16. Winzer K, Williams P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. Int. J. Med. Microbiol. 2001;291:131-143. doi: 10.1078/1438-4221-00110.

Стаття надійшла до редакції 08.06.2018 р.



А. Ю. Пастошук<sup>1</sup>, Л. М. Сківка<sup>1</sup>, Л. М. Буценко<sup>2</sup>,  
В. П. Патика<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
вул. Володимирська, 64/13, Київ, Україна, 01601

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ,  
вул. Заболотного, 154, Київ, Україна, 03143  
e-mail: kotsyuk93@ukr.net

## ВПЛИВ ЗБУДНИКА БАЗАЛЬНОГО БАКТЕРІОЗУ НА ПРОРОСТАННЯ ЗЕРЕН ТА РІСТ ПАРОСТКІВ ПШЕНИЦІ РІЗНИХ СОРТІВ

**Мета.** Дослідити вплив збудника базального бактеріозу *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* та його ліпополісахариду (ЛПС) на схожість зерен і ріст паростків пшениці різних сортів. **Методи.** Для досліджень використовували зерна тринадцяти сортів ярої та озимої пшениці української і закордонної селекції. Для обробки зерен застосовували живі клітини та ЛПС штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013, який зберігається у колекції культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ. Облік схожості проводили на другу добу пророщування у вологій камері за температури 27 °С, довжину паростків вимірювали – на 4 добу. **Результати.** Обробка зерен пшениці більшості сортів суспензією живих клітин та ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 призводила до зниження їх схожості. Схожість зерен сортів озимої пшениці української селекції Подільська, Столична і Золотоколоса достовірно не змінювалася за оброблення суспензією клітин збудника. ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 спричиняв статистично вірогідну стимуляцію росту паростків пшениці сорту Столична. **Висновки.** Сорт озимої пшениці української селекції Столична може розглядатися як перспективний для вирощування у регіонах України з високим ризиком інфікування збудником базального бактеріозу.

*Ключові слова:* базальний бактеріоз, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, ліпополісахарид, пшениця.

Пшениця є основною сільськогосподарською культурою в Україні. Наша країна входить до десятки країн, які вирощують найбільшу кількість цієї зернової культури. Отриманню високих урожаїв пшениці в Україні сприяють ґрунтово-кліматичні умови, які є сприятливими для її росту в більшості областей [7]. Найбільші посівні площі пшениці зосереджено в Запорізькій, Одеській, Дніпропетровській, Харківській і Херсонській областях. Не зважаючи на доволі сприятливі умови для пшениці в Україні, значних економічних збитків при вирощуванні цієї культури завдають шкідники і бактеріальні хвороби [2, 7]. В останні роки відзначається тенденція до зростання ураженості пшени-



ці збудниками бактеріозів [6, 10 – 12]. Серед збудників бактеріальних хвороб пшениці найпоширенішим в Україні є *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* [2, 6] – збудник базального бактеріозу. Базальний бактеріоз характеризується широкою розповсюдженістю і спричиняє значне зниження врожаю пшениці.

Основним методом запобігання ураження рослин збудниками бактеріозів є вирощування в районах з високою вірогідністю розвитку цих хвороб сортів рослин, які є стійкими до фітопатогенних бактерій. Для визначення стійкості сортів до збудників бактеріальних хвороб застосовують методи штучної інокуляції насіння та вегетуючих рослин, методи клітинної селекції та ін. [2, 8]. Як чинники селекції можуть бути використані живі клітини збудників, а також токсичні речовини, що продукуються збудниками, зокрема, ліпопоцукриди (ЛПС) фітопатогенних бактерій. ЛПС відіграють важливу роль в патогенезі бактеріозів пшениці. Вони характеризуються фітотоксичною активністю і здатні індукувати захисні реакції у рослин [3, 9].

З огляду на вищезазначене метою роботи було дослідження впливу збудника базального бактеріозу на схожість зерен і ріст паростків пшениці різних сортів та визначення більш стійких до *P. syringae* pv. *atrofaciens* сортів, які можуть бути рекомендовані до вирощування у районах із високою загрозою даного збудника.

### Матеріали і методи досліджень

У роботі використовували зерна пшениці врожаю 2017 року сортів Хуторянка, Печерянка, Подолянка, Столична, Смуглянка, Золотоколоса, Фаворитка, Трипільська, Діскус, Хукулус, Гренні, Тацитус, Патрас, характеристика яких наведена в табл. 1.

Для обробки зерен пшениці застосовували живі клітини та ЛПС штаму *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013, який був виділений з уражених бактеріозом рослин і зберігається у колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ.

*P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 вирощували на картопляному агарі за 28 °С впродовж 24–48 год. Клітини бактерій змивали фізіологічним розчином та готували суспензію титром 10<sup>9</sup> КУО/мл за стандартом мутності. ЛПС екстрагували з сирі бактеріальної маси 0,85% розчином хлориду натрію при температурі 4 °С протягом 4–5 год, як описано раніше [1]. Екстракти центрифугували (6000 g, 15 хв), очищували діалізом в дистильованій воді протягом доби і висушували ліофільно. Для постановки дослідів використовували розчин ЛПС з концентрацією 5 мг/мл.

Зерна пшениці промивали водогінною, а потім стерильною дистильованою водою та розкладали у чашки Петрі на стерильний фільтрувальний папір по 20 зерен. В кожному варіанті дослідів використовували не менше 60 зерен пшениці. У чашки Петрі вносили відповідно до варіанту дослідів 5 мл води (контроль), 5 мл суспензії клітин або 5 мл розчину ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013. Облік схожості зерен проводили на другу добу пророщування у вологій камері за температури 27 °С, довжину паростків вимірювали на 4 добу.





Таблиця 1

## Характеристика досліджуваних сортів пшениці

Table 1

## Characteristics of investigated varieties of wheat

Назва сорту	Вид культури	Рекомендована зона для вирощування	Країна походження	Зимостійкість	Посухостійкість	Стійкість до хвороб
Печерянка	Яра, м'яка	Лісостеп	Україна	Середня	Середня	Вище середньої
Гренні	Яра, м'яка	Полісся	Німеччина	Висока	Висока	Висока
Хуторянка	Озима	Лісостеп	Україна	Середня	Середня	Вище середньої
Діскус	Озима	Лісостеп	Німеччина	Висока	Висока	Висока
Хукулус	Озима, м'яка	Лісостеп, Полісся	Франція	Відмінна	Відмінна	Висока
Тацітус	Озима, м'яка	Лісостеп	Австрія	Відмінна	Висока	Середня
Патрас	Озима, м'яка	Лісостеп, Полісся	Німеччина	Висока	Висока	Висока
Подольянка	Озима, м'яка	Степ, Лісостеп, Полісся	Україна	Висока	Висока	Середня
Столична	Озима, м'яка	Лісостеп, Полісся	Україна	Вище середньої	Середня	Середня
Смуглянка	Озима, м'яка	Степ, Лісостеп, Полісся	Україна	Вище середньої	Висока	Висока
Золотоколоса	Озима, м'яка	Степ, Лісостеп, Полісся	Україна	Висока	Середня	Висока
Фаворитка	Озима	Степ, Лісостеп, Полісся	Україна	Висока	Середня	Висока
Трипільська	Озима, м'яка	Степ, Лісостеп, Полісся	Україна	Висока	Висока	Висока

Дослідження проведені не менше, ніж у трьох повторях. Статистичне опрацювання результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики з розрахунком середнього значення ( $M$ ) та середньої квадратичної похибки ( $m$ ). Для визначення вірогідності відмінності показників між дослідом та контролем використовували  $t$ -критерій Стьюдента. Статистично достовірними вважали відмінності між показниками при  $p \leq 0,05$ .

### Результати досліджень та їх обговорення

Для вивчення впливу *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 на схожість



зерен і ріст паростків пшениці нами було використано зерна озимої (11 сортів) та ярої (2 сорти) пшениці української (9 сортів) та закордонної селекції (табл. 1). Усі зазначені сорти внесено до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні [4].

ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013, який було отримано нами для дослідження, мав хімічний склад подібний до раніше досліджених ЛПС цього виду бактерій і містив 30% вуглеводів, 28% білків, 5% нуклеїнових кислот та 2-кето-3-дезоксиктонову кислоту [1, 9].

Більшість досліджених сортів пшениці виявилися чутливими як до самого збудника базального бактеріозу, так і до його ЛПС.

Обробка зерен пшениці 9 сортів суспензією живих клітин *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 призводила до зниження його схожості. Лише схожість зерен сортів пшениці Подолянка, Столична і Золотоколоса достовірно не змінювалася (рис. 1). Незначно (на 10%) знижувалася схожість зерен сортів пшениці Діскус та Тацитус, на 20% – сортів Печерянка, Хуторянка, Патрас.

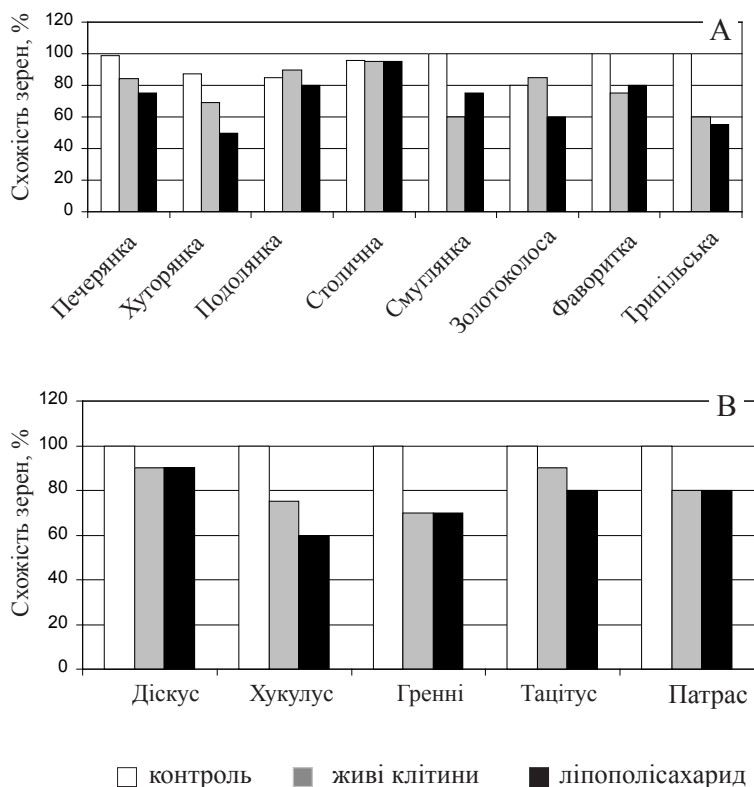


Рис. 1. Вплив оброблення суспензією живих клітин і ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 на схожість зерен пшениці вітчизняної (А) та зарубіжної (В) селекції

Fig. 1. The effect of treatment with a suspension of living cells and LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens* UKM B-1013 on the germination of seeds of wheat varieties of domestic (A) and foreign (B) breeding



Приблизно на 30% зменшувалася схожість насіння у сортів Хукулус, Гренні, Фаворитка. Найбільш істотно оброблення живими клітинами збудника базального бактеріозу вплинуло на зерна сортів Смуглянка та Трипільська. Схожість насіння цих сортів зменшилася на 40% порівняно із контролем (рис. 1).

Оброблення зерен пшениці розчином ЛПС збудника базального бактеріозу також призводило до зниження його схожості. Лише для зерен сорту пшениці Столична, схожість якого не зменшувалася за оброблення живими клітинами *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013, не відмічали зменшення схожості після експозиції розчином ЛПС. Для зерен 7 досліджених сортів пшениці (Печерянка, Хуторянка, Хукулус, Тацітус, Подолянка, Золотоколоса, Трипільська) відмічено більш істотне зниження схожості за експозиції розчином ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 у порівнянні з обробленням суспензією живих клітин збудника.

Встановлено також пригнічення росту паростків пшениці дванадцяти досліджених сортів за оброблення зерен суспензією живих клітин та розчином ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 (табл. 2). Лише для пшениці сорту Столична було виявлено достовірну стимулювальну активність ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013: довжина кореня паростка оброблених зерен була на 36% більша ніж в контролі (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив живих клітин та ліпополісахариду *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В -1013 на ріст кореня паростків пшениці

Table 2

The effect of living cells *P. syringae* pv. *atrofaciens* UKM B-1013 and their lipopolysaccharides on root growth of wheat seedlings

Сорт пшениці	Суспензія бактерій		ЛПС		Контроль, мм
	Довжина, мм	% від контролю	Довжина, мм	% від контролю	
Печерянка	2,3±0,8*	64	2,7±0,1*	75	3,6±0,2
Хуторянка	2,7±0,7*	62	2,5±0,3*	61	4,5±0,5
Діскус	1,9±0,2*	48	2,6±0,51*	64	4,0±0,4
Хукулус	2,0±0,6*	56	2,7±0,6	75	3,6±0,5
Гренні	1,6±0,3*	43	2,7±0,1*	71	3,7±0,4
Тацітус	1,2±0,3*	54	1,6±0,4	72	2,2±0,2
Патрас	1,5±0,3*	60	1,7±0,2*	68	2,5±0,3
Подолянка	1,7±0,3	74	1,9±0,2	83	2,3±0,2
Столична	1,3±0,3	113	1,5±0,5	136	1,1±0,1
Смуглянка	0,2±0,1*	11	0,5±0,1*	26	1,8±0,6
Золотоколоса	1,8±0,3	79	2,4±0,3	104	2,3±0,5
Фаворитка	0,7±0,3*	25	0,9±0,4*	33	2,8±0,6
Трипільська	1,4±0,2	70	1,3±0,1*	65	2,0±0,5

Примітка\* –  $p < 0,05$ , порівняно з контролем.



За даними Грицай та співавторів обробка насіння томатів, огірків, капусти і пшениці розчинами ЛПС різних штамів *P. syringae* стимулювала проростання насіння [3]. Крім того, томати і огірки, які розвивалися з насіння, обробленого розчинами ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* та *P. syringae* pv. *tomato*, росли швидше та утворювали більше квіткових бруньок. Отже, ЛПС різних штамів *P. syringae* у невеликих концентраціях можуть стимулювати ріст рослин.

Живі клітини та ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 найбільшою мірою знижували енергію проростання пшениці сортів Смуглянка і Фаворитка. Довжина корінця паростків за оброблення зерен цих сортів живими клітинами *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 становила 11 і 25% від контролю, відповідно (табл. 2). Оброблення зерен цих сортів ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 пригнічувало ріст коренів паростків на 74 і 67% відповідно.

Проростання зерен решти сортів характеризувалося помірною чутливістю до збудника базального бактеріозу. Довжина кореня зменшувалася на 30–40% порівняно із контролем. При цьому для всіх сортів оброблення ЛПС мало менший вплив на ріст паростків ніж оброблення живими клітинами збудника.

Результати проведеного дослідження не виявили суттєвої різниці в чутливості до збудника базального бактеріозу сортів озимої і ярої пшениці. За результатами вивчення впливу *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 на схожість зерен та ріст паростків пшениці досліджені сорти можна розділити на три групи. Найбільш чутливими до збудника є сорти Смуглянка, Фаворитка і Трипільська. Найбільш стійким є сорт озимої пшениці української селекції Столична. Решта сортів характеризуються помірною чутливістю до *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Цікаво відзначити, що сорт пшениці Столична характеризується середньою стійкістю до збудників грибних хвороб, а сорти Смуглянка, Фаворитка і Трипільська – високою толерантністю [5]. Це свідчить про те, що стійкість до бактеріальних і грибних патогенів, ймовірно, зумовлена різними детермінантами.

ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 характеризується фітотоксичною активністю до зерен чутливих до збудника базального бактеріозу сортів пшениці. Експозиція ЛПС зерен стійкого сорту Столична спричиняла стимуляцію росту паростків.

Найбільш чутливими до збудника базального бактеріозу є сорти пшениці Смуглянка та Фаворитка: проростання насіння за впливу живих клітин та ЛПС знижується, в середньому, на 30%, а ріст кореня – на 82 та 72% відповідно. Сорти Трипільська, Печерянка, Хуторянка, Діскус, Хукулус, Гренні, Тацитус, Патрас, Подолянка та Золотоколоса характеризуються помірною чутливістю до *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Найбільш стійким є сорт Столична. Обробка живими клітинами збудника та його ЛПС не чинила негативного впливу на проростання зерна цього сорту пшениці і помірно (на 13 та 36% відповідно) посилювала проростання кореню. Отримані результати дають підставу вважати сорт Столична перспективним для використання у регіонах України з високим ризиком інфікування збудником базального бактеріозу.



А. Ю. Пастошук<sup>1</sup>, Л. М. Скивка<sup>1</sup>, Л. Н.Буценко<sup>2</sup>,  
В. Ф. Патыка<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,  
ул. Владимирская, 64/13, Киев, Украина, 01601

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАНУ,  
ул. Заболотного 154, Киев, Украина, 03143  
e-mail:kotsyuk93@ukr.net

## ВЛИЯНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАЗАЛЬНОГО БАКТЕРИОЗА НА ПРОРАСТАНИЕ ЗЕРЕН И РОСТ ПОБЕГОВ ПШЕНИЦЫ РАЗНЫХ СОРТОВ

### Реферат

**Цель.** Исследование влияния возбудителя базального бактериоза *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* и его липополисахарида (ЛПС) на всхожесть зерен и рост побегов различных сортов пшеницы. **Методы.** Для исследования использовали зерна тринадцати сортов яровой и озимой пшеницы украинской и зарубежной селекции. Для обработки зерен применяли живые клетки и ЛПС штамма *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013, который содержится в коллекции живых культур отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАНУ. Учет всхожести зерен проводили на вторые сутки проращивания во влажной камере при температуре 27 °С, длину побегов измеряли – на 4 сутки. **Результаты.** Обработка зерен пшеницы большинства сортов суспензией живых клеток и ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 приводила к снижению их всхожести. Всхожесть зерен сортов озимой пшеницы украинской селекции Подольнка, Столичная и Золотоколосая достоверно не менялась при обработке суспензией клеток возбудителя. ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 вызывал статистически достоверную стимуляцию роста побегов пшеницы сорта Столичная. **Вывод.** Сорт озимой пшеницы украинской селекции Столичная может рассматриваться как перспективный для выращивания в регионах Украины с высоким риском инфицирования возбудителем бактериального бактериоза.

**Ключевые слова:** базальный бактериоз, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, липополисахарид, пшеница.

А. Yu. Pastoshchuk<sup>1</sup>, L. M. Skivka<sup>1</sup>, L.M. Butsenko<sup>2</sup>,  
V. P. Patyka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv,  
64/13, Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 01601

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU  
154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, Ukraine, 03143

## EFFECT OF CAUSAL AGENT OF BASAL BACTERIOSIS ON SEED GERMINATION AND ROOT GROWTH OF DIFFERENT WHEAT VARIETIES

### Summary

**Aim.** To investigate the effect of causal agent of basal bacteriosis *Pseudomonas*



*syringae* pv. *atrofaciens* and its lipopolysaccharide (LPS) on seed germination and growth of seedlings of various wheat varieties. **Materials and methods.** Seeds of thirteen varieties of spring and winter wheat of Ukrainian and foreign selection were used for the study. For the treatment of seeds, live cells and LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens* UKM V-1013 from the collection of live cultures of the Department of Phytopathogenic Bacteria of the Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU were used. The seed germination was registered on the second day after the treatment, the length of sprouts – on the fourth day. **Results.** Treatment of wheat seeds of the most varieties with a suspension of living cells and LPS of *P. syringae* pv. *atrofaciens* UKM B-1013 led to the decrease in their germination. The germination of seeds of winter wheat varieties of Ukrainian selection Podolyanka, Stolichnaya and Zolotokolosaya did not change reliably when was treated with living cell suspension. LPS of *P. syrynae* pv. *atrofaciens* UKM B-1013 caused statistically significant stimulation of growth of wheat sprouts of the Stolichnaya variety. **Conclusion.** Winter wheat of Ukrainian selection Stolichnaya can be considered as promising variety for growing in the regions of Ukraine with a high risk of infection with the causal agent of basal bacteriosis.

*Key words:* wheat, basal bacteriosis, *Pseudomonas syringae* pv. *Atrofaciens*, lipopolysaccharide.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Буценко Л. М. Генотулювальна активність культуральної рідини та ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UKM B-1027 // Науковий вісник УжУ, серія: Біологія. – 2008. – Вип. 22. – С. 80–83.
2. Гвоздяк Р. И., Пасичник Л. А., Яковлева Л. М. и др. Фитопатогенные бактерии. Бактериальные болезни растений : Монография – К.: ТОВ «НВП «Интерсервис», 2011. – 58 с.
3. Грицай Р. В., Яковлева Л. М., Варбанець Л. Д. Фітотоксичні властивості ліпополісахаридів *Ralstonia solanacearum* // Мікробіол. журн. – 2014. – 76, № 2. – С. 29–34.
4. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2017 рік / Міністерство аграрної політики та продовольства України. – Київ, 2017.
5. Моргунов В. В., Санін Є. В., Швартау В. В. Клуб 100 центнерів. Сучасні сорти та системи живлення і захисту озимої пшениці. Видання VIII. – К.: Логос, 2014. – 148 с.
6. Пасичник Л. А., Савенко Е. А., Буценко Л. Н., Патика В. Ф., Калиниченко А. В. *Pseudomonas syringae* в агрофітоценозі пшениці // Наука и мир. – 2014. – № 4 (8). – С. 52–56.
7. Бушуляк М. А. Характеристика сортів пшениці озимої селекції за показниками, що зумовлюють стійкість-сприйнятливості до *Septoria tritici* в Степу України // Насінництво. – 2015. – № 1 (144). – С. 1–2.
8. Чугункова Т. В. Використання клітинної селекції для створення стійких форм буряків // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 6 – С. 509–515.
9. Bogdan Y. M., Pasichnyk L. A., Vaschenko L. M., Gvozdyak R. I. Chemical composition and genotoxicity of lipopolysaccharide of *Pseudomonas syringae* pv.



*atrofaciens* 9400 // Internat. scientific confer. "S.P.Kostychev and contemporary agricultural microbiology" (Yalta, 8 – 12 october, 2007): Abstracts. – Yalta, 2007. – P. 42.

10. Kazempour M. N., Kheyrgoo M., Pedramfar H., and Rahimian H. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran // *African Journal of Biotechnology*. – 2010. – v. 9, N 20. – P. 2860–2865.

11. Pasichnik L. A., Patyka V. F., Khodos S. F., Vinnichuk T. S. Basal bacteriosis of wheat and influence of agrotechnical methods on its spread // *Mikrobiol. Zhur.* – 2012. – 74(4). – P. 37–44.

12. Valencia-Botin A. J., Cisneros-Lopez M. E. A review of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat // *International Journal of Agronomy*. – 2012. – v.5, N1. – P.1–5.

### References

1. Butsenko LM. Henomoduliuvalna aktyvnist kulturalnoi ridyny ta lipopolisakharydu *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UKM V-1027. *Naukovyi visnyk UzhU, seriia: Bioloheia*. 2008; (22): 80–83 [In Ukrainian].

2. Hvozdiak RY, Pasychnyk LA, Yakovleva LM y dr. Fytopatohennye bakteryy. Bakteryalne bolezny rastenyi : Monohrafyia. Kyiv. TOV «NVP «Ynterservys». 2011. – 58 p. [In Ukrainian].

3. Gritsay RV, Yakovleva LM, Varbanets LD. Phytotoxic properties of *Ralstonia solanacwarum* lipopolysaccharides. *Mikrobiol. Z.* 2014;76(2):29-34 [In Ukrainian].

4. Derzhavnyi reiestr sortiv roslyn, prydatnykh dlia poshyrennia v Ukraini na 2017 rik / Ministerstvo ahrarynoi polityky ta prodovolstva Ukrainy. – Kyiv, 2017 [In Ukrainian].

5. Morhun VV, Sanin YeV, Shvartau VV. Klub 100 tsentneriv. Sychasni sorty ta systemy zhyvlennia i zakhystu ozymoi pshenytsi. Vydannia VIII. Kyiv. Lohos. 2014. 148 p. [In Ukrainian].

6. Pasychnyk LA, Savenko EA, Butsenko LN, Patyka VF, Kalynychenko AV. *Pseudomonas syringae* v ahrofytotensoze pshenytsy // *Nauka y myr*. 2014; 4 (8):52–5 [In Ukrainian].

7. Bushulian MA. Kharakterystyka sortiv pshenytsi ozymoi seleksii za pokaznykamy, shcho zumovliuiut stiikist-spryniatlyvist do *Septoria tritici* v Stepu Ukrainy. *Nasinnytstvo*. 2015;1 (144):1–2 [In Ukrainian].

8. Chuhunkova TV. Vykorystannia klityynnoi seleksii dlia stvorennia stiikykh form buriakiv // *Fyzyolohyia y byokhymyia kult. rastenyi*. 2009; 41(6): 509-51 [In Ukrainian].

9. Bogdan Y.M., Pasichnyk L.A., Vaschenko L.M., Gvozdyak R.I. Chemical composition and genotoxicity of lipopolysaccharide of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9400. In: Proceedings of International Scientific conference "S.P.Kostychev and contemporary agricultural microbiology". Yalta. 2007:42.

10. Kazempour MN, Kheyrgoo M, Pedramfar H, and Rahimian H. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9(20): 2860–2865.



11. Pasichnyk LA, Patyka VF, Khodos SF, Vinnichuk TS. Basal bacteriosis of wheat and influence of agrotechnical methods on its spread. Mikrobiol. Zhur. 2012; 74(4): 37-44.

12. Valencia-Botin AJ, Cisneros-Lopez ME. A review of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat. International Journal of Agronomy. 2012; 5(1): 1-5.

Стаття надійшла до редакції 02.05.2018 р.





**О. Ю. Зінченко, С. Л. Міресь**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,  
e-mail: farmikr@ukr.net, till2002@ukr.net

## АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ МІЦЕЛІЮ ТА ЕКСТРАКТІВ ПЛОДОВИХ ТІЛ *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS) P. KARST.

**Мета роботи.** Визначення впливу біологічно активних речовин безпосередньо вегетативного міцелію та водних екстрактів плодових тіл двох штамів *Ganoderma lucidum* на ріст умовно-патогенних мікроорганізмів. **Матеріали та методи.** Методом дифузії в агар визначали антимікробну активність вегетативного міцелію та водних екстрактів плодових тіл штамів трутовика лакованого *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. ONU F101 та ONU F102. Як тест-об'єкти використовували штами бактерій *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 та дріжджоподібних грибів *Candida albicans* ATCC 18804. **Результати.** Встановлено, що обидва штами трутовика при сумісному культивуванні з умовно-патогенними мікроорганізмами пригнічують їх ріст. Активність водних екстрактів плодових тіл грибів більш низька у порівнянні з вегетативним міцелієм. Різні за походженням штами досліджуваних грибів відрізняються за рівнем та спектром антимікробної дії. **Висновки.** Антимікробна активність штаму *G. lucidum* ONU F101 виявилася вищою, ніж штаму ONU F102. Меншу активність у порівнянні із вегетативним міцелієм показали відповідні водні екстракти плодових тіл.

**Ключові слова:** *Ganoderma lucidum*, антимікробна активність, умовно-патогенні мікроорганізми.

На сьогодні пошук нових джерел антибіотиків є досить актуальним та важливим напрямком [20]. Традиційно як продуценти антибіотичних сполук розглядалися нижчі гриби, однак в останні десятиріччя спостерігається зростаючий інтерес до вивчення біологічної активності метаболітів вищих макроміцетів [3, 4, 6]. Серед таких *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. – трутовик лакований (ганодерма блискуча, також рейші), є одним з найвідоміших базидіальних грибів, що використовувалися в лікувальних цілях з давнього часу [2].

Сучасні дослідження грибів *G. lucidum* і *G. applanatum* дали змогу виділити з них понад 400 біологічно активних сполук різної хімічної природи й фармакологічних властивостей, а використання відповідних тест-систем, результати дослідів на тваринах і клінічні спостереження засвідчили, що препарати, отримані грибів з цих видів, мають онкостатичні, імуномодулювальні,



антиоксидантні, антибактеріальні, гепатопротекторні, адаптогенні, гіполіпідемічні, гіпоглікемічні, протівірусні, протизапальні та інші цінні лікувально-профілактичні властивості [2, 3, 11, 14].

Для представників роду *Ganoderma* показано високий ступінь активності щодо лікування інфекції, спричиненої різними видами стафілококів, стрептококів та мікоплазм, але цю активність здебільшого пов'язують зі стимуляцією імунної відповіді, а не з дією безпосередньо на клітини збудника [12, 14, 15, 22].

Показано, що лікувальні властивості гриба значною мірою залежать від штаму, умов культивування та екстрагування біологічно активних речовин [1, 2, 4, 5, 8], тому метою даної роботи було визначення впливу речовин вегетативного міцелію та водних екстрактів плодових тіл штамів *Ganoderma lucidum* на ріст умовно-патогенних мікроорганізмів.

### Матеріали і методи

Визначали антагоністичну активність двох штамів *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. ONU F101 та ONU F102, отриманих з колекції Біотехнологічного науково-навчального центру ОНУ. Перший штам отриманий з колекції лікарських базидіоміцетів (м. Ханой, В'єтнам), штам F102 інтродукований у колекцію БННЦ ОНУ з дикого зразка, знайденого в Одеській області.

Як тест-об'єкти використовували штами бактерій, рекомендовані для визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 та дріжджоподібних грибів *Candida albicans* ATCC 18804 [18].

Тест-штами отримані з музею культур мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб імені Л. В. Громашевського АМН України.

Антагоністичну активність грибів визначали методом радіальних штрихів. Для цього міцелій ганодерми вирощували на поверхні неохмленого 7 °В сусло-агару у чашках Петрі при температурі 25 °С протягом 4–5 діб до повного заростання чашки міцелієм [10].

Після заростання поверхні середовища міцелієм стерильним пробковим свердлом вирізали агаровий блок діаметром 20 мм, та розміщували його на поверхні м'ясо-пептонного агару (МПА) в чашці Петрі [16].

Добові культури тест-штамів, вирощені на скошеному МПА, змивали стерильним фізіологічним розчином та доводили концентрацію мікробних клітин до  $10^9$  у мл за оптичним стандартом мутності.

З отриманих суспензій за допомогою бактеріологічної петлі робили висів по радіусам чашки, проводячи шрих від блока з грибом до периферії.

Посіви інкубували при 30 °С протягом 24 та 48 год. Антагоністичну активність оцінювали, вимірюючи розміри зон затримки росту тест-штамів.

Водні екстракти грибів отримували таким чином: заливали попередньо підсушені та подрібнені за допомогою блендера плодові тіла гарячою водою у співвідношенні 1:5, та нагрівали до 90 °С протягом 90 хв, охолоджували та фільтрували через стерильні паперові фільтри [9].

Плодові тіла отримували за раніше розробленою та оптимізованою тех-



нологією на субстраті складу: 50% соломи пшениці, 20% соломи ячменю та 20% соломи вівса, 8% гречаної муки та 2% гіпсу [7].

Вплив екстрактів на ріст мікроорганізмів визначали методом лунок. Добові культури тест-штамів на скошеному МПА змивали стерильним фізіологічним розчином, доводили вміст бактерій до  $10^7$  кл/мл за оптичним стандартом мутності, наносили 0,1 мл суспензії клітин на поверхню МПА в чашці Петрі та ретельно розтирали стерильним шпателем Дригальського.

Стерильним пробковим свердлом вирізали в засіяному середовищі лунки діаметром 8 мм, в які вносили 1 мл екстракту [16].

Посіви інкубували при 37 °С протягом 24 год. Вплив екстрактів оцінювали, вимірюючи діаметр зони затримки росту навколо лунки. Від отриманого результату віднімали діаметр лунки (8 мм) та вважали отримані дані дійсним розміром зони пригнічення.

Усі досліди проводили в п'яти повторах. Отримані в ході дослідження дані з чутливості окремих тест-штамів (значення розмірів зон затримки росту) до активних сполук вегетативного міцелію та екстрактів плодових тіл порівнювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні, оцінюючи достовірність відмінностей отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ( $p \leq 0,05$ ). У таблицях і на рисунках представлено середні значення показників.

### Результати та їх обговорення

При вивченні антагоністичної активності *G. lucidum* F101 щодо тест-мікроорганізмів встановлено, що найбільшу чутливість до метаболітів гриба при сумісному культивуванні виявляють дріжджоподібні гриби *C. albicans* та тест-штам *E. faecalis*. Розміри зон затримки росту по штриху через 24 год склали відповідно 11,4 мм та 10,6 мм (рис. 1). Приблизно однаковий пригні-

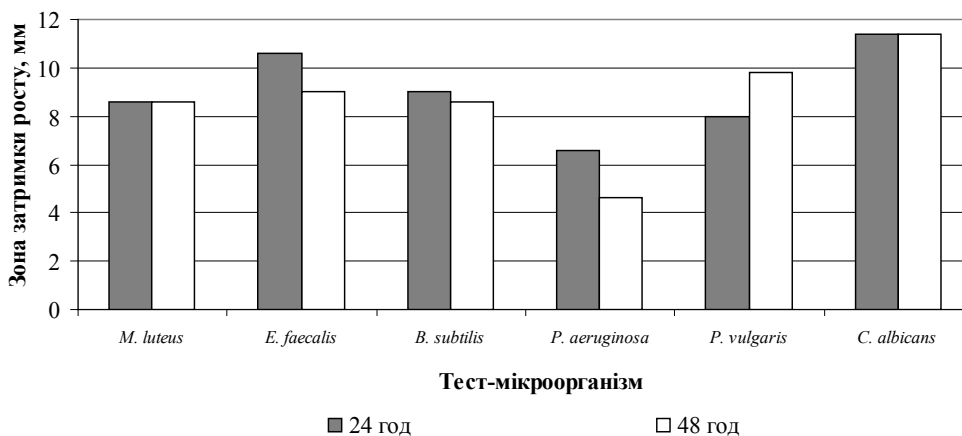


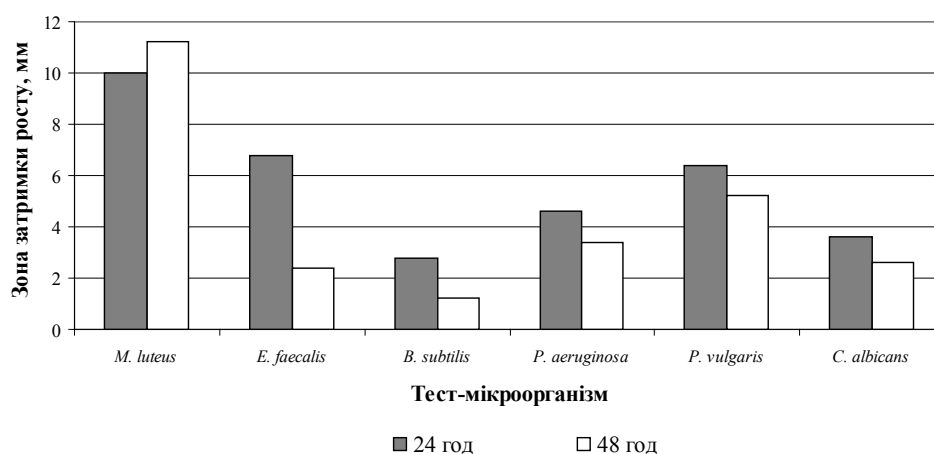
Рис. 1. Розміри зон затримки росту тест-мікроорганізмів при сумісному культивуванні з *Ganoderma lucidum* F101

Fig. 1. Size of growth inhibition zones of test-microorganisms during joint cultivation with *Ganoderma lucidum* F101

чувальний ефект спостерігали в культурах *B. subtilis*, *M. luteus* і *P. vulgaris*: 9,0 мм, 8,6 та 8,0 мм, відповідно. Найменш чутливою до метаболітів гриба виявилася культура *P. aeruginosa*, для якої розмір зони затримки росту по штриху складав 6,6 мм через 24 години.

Слід зазначити, що у більшості варіантів через 48 год спостерігали зменшення розмірів стерильної зони, однак у випадку *P. vulgaris* вона збільшувалася з 8,0 до 9,8 мм. Факт розширення зони затримки росту вимагає подальшого, більш детального дослідження.

При вивченні антагоністичної активності *G. lucidum* F102 щодо тест-мікроорганізмів встановлено, що найбільшу чутливість до метаболітів гриба при сумісному культивуванні виявляв *M. luteus*, для якого розмір зони затримки росту по штриху складав 10,0 мм через 24 год та збільшувався протягом наступної доби до 11,2 мм (рис. 2). Деякими авторами [19] вказується на



**Рис. 2.** Розміри зон затримки росту тест-мікроорганізмів при сумісному культивуванні з *Ganoderma lucidum* F102

Примітка:\* – відмінності достовірні на рівні значимості не менше 95 % ( $p \leq 0,05$ ) у порівнянні із штамом F101

**Fig. 2.** Size of growth inhibition zones of test-microorganisms during joint cultivation with *Ganoderma lucidum* F102

Note:\* – the differences are significant at the level of significance not less than 95% ( $p \leq 0.05$ ) compared to F101 strain

виявлення в екстрактах ганодерми лізоциму, до якої клітини мікрокока є дуже чутливими. Це могло б певною мірою служити поясненням розширення зони затримки росту. Однак, аналогічна дія водного екстракту саме на цю культуру (див. табл. 1) викликає сумніви в тому, що лізуючим агентом виступав саме лізоцим, оскільки екстракти отримували при високих температурах, які неодмінно викликали денатурацію ферменту. Також спостерігалось досить значне пригнічення росту *E. faecalis* і *P. vulgaris*: розмір зони затримки росту через добу складав відповідно 6,8 мм та 6,4 мм. Найменшою чутливістю до метаболітів гриба серед бактеріальних тест-штамів характеризувалися



*P. aeruginosa* (затримка росту по штриху через 24 год – 4,6 мм) та *B. subtilis* (2,8 мм), а також дріжджоподібні гриби *C. albicans* (3,6 мм). Для всіх тест-штамів, крім *M. luteus*, протягом другої доби культивування спостерігали зменшення пригнічувального ефекту.

Таким чином, штам *G. lucidum* F101 у цілому виявився більш активним щодо тест-мікроорганізмів. Найбільша чутливість до антагоністичної дії гриба зареєстрована у дріжджоподібних грибів *p. Candida*. Серед бактеріальних тест-штамів ріст грамозитивних бактерій пригнічувався більшою мірою, ніж грамнегативних.

При сумісному культивуванні тест-мікроорганізмів з *G. lucidum* F102 не виявлено особливостей впливу на грамнегативні та грамозитивні бактерії в цілому, оскільки найбільш чутливими були клітини *M. luteus*, проте культура *B. subtilis* характеризувалася найменшою чутливістю серед усіх тест-штамів. Також, на відміну від *G. lucidum* F101, штам F102 незначно пригнічував ріст *C. albicans*.

Отримані результати свідчать про відмінності у спектрі метаболітів, що синтезуються обома штамми. Зменшення зон затримки росту тест-мікроорганізмів протягом другої доби, ймовірно, є результатом адаптації бактерій до сполуки, що викликала пригнічення, або нестабільністю її в агаризованому середовищі.

При вивченні впливу водних екстрактів обох штамів *G. lucidum* максимальну затримку росту спостерігали для культури *M. luteus*: діаметри стерильних зон навколо лунок з екстрактами склали 10,0 та 8,2 мм (табл.).

Слід зазначити, що розмір зони навколо лунок з екстрактом *G. lucidum* F102 протягом другої доби збільшувався (9,8 мм). Екстракт штаму *G. lucidum* F101 також спричиняв помітний пригнічувальний ефект у культурах *P. vulgaris* (діаметр стерильної зони 9,6 мм), *E. faecalis* (8,6 мм) та *B. subtilis* (7,6 мм). Екстракт з другого штаму мав значно меншу активність щодо цих мікроорганізмів (5,6 мм, 5,2 мм та 3,4 мм, відповідно).

Найменш чутливими до метаболітів обох штамів виявилися клітини *P. aeruginosa* та *C. albicans*. Розміри зони затримки росту, спричиненої дією екстракту штаму *G. lucidum* F101 склали 5,2 мм та 5,6 мм, штаму *G. lucidum* F102 – 3,8 мм та 2,0 мм відповідно.

Автономовою А.В. [1] і Quereshi зі співавт. [20] спостерігався приблизно такий самий пригнічувальний вплив водних екстрактів плодкових тіл, отриманих, відповідно, в штучних умовах, та в природних, щодо *B. subtilis*. У роботі [19] було виявлено більш високу активність щодо *M. luteus*, *P. aeruginosa* та *C. albicans*, однак з десяти досліджуваних штамів її проявляли лише три. Також значну антимікробну дію у відношенні синьогнійної палички описано Quereshi зі співавт. [20]. Sánchez та Demain [21] виявлено високу активність щодо *B. subtilis* на тлі відсутності пригнічувальної дії щодо псевдомонад.

Слід зазначити, що антимікробна активність штаму F102 виявилася нижчою, ніж у штаму F101, що може бути пов'язано з походженням цих грибів. Штам F101 був отриманий з колекції лікарських базидіоміцетів, що культивуються у В'єтнамі, а штам F102 – інтродукований у колекцію з дикого зразка, знайденого в Одеській області. Очевидно, як і в роботах інших

дослідників [1, 20], спектр утворюваних метаболітів з антимікробною дією є штамспецифічною ознакою.

Таблиця

Діаметри (мм) зон затримки росту навколо лунок з екстрактами  
*Ganoderma lucidum*

Table

Diameters of growth inhibition zones around wells  
with *Ganoderma lucidum* extracts (mm)

Тест- мікроорганізм	Штам			
	<i>G. lucidum</i> F 101		<i>G. lucidum</i> F 102	
	24 год	48 год	24 год	48 год
<i>M. luteus</i> ATCC 4698	10,0±0,63	8,8±0,33	8,2±0,44*	9,8±0,66
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	8,6±0,36	8,6±0,36	5,6±0,36*	5,6±0,36*
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	7,6±0,61	7,6±0,61	3,4±0,22*	2,2±0,18*
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	5,2±0,52	4,8±0,18	3,8±0,18*	3,8±0,18
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6896	9,6±0,73	9,6±0,73	5,2±0,18*	5,2±0,18*
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	5,6±0,46	5,6±0,46	2,0±0,4*	2,0±0,4*

Примітка:\* – відмінності достовірні на рівні значимості не менше 95% ( $p \leq 0,05$ ) у порівнянні із штамом F101

Note: \* – the differences are significant at the level of significance not less than 95% ( $p \leq 0,05$ ) compared to F101 strain

У цілому, активність екстрактів щодо тест-мікроорганізмів відповідала антагоністичній активності грибів при їх сумісному культивуванні з тест-штамами, однак для деяких мікроорганізмів була дещо нижчою. Вірогідно, при гарячій екстракції метаболітів частина термолабільних сполук могла інактивуватися, що призвело до зміни ефекту. Відомо, що деякі глюкани ганодерми, які мають високу біологічну активність та асоційовані з протеїновим компонентом [2], який може денатуруватися при високих температурах. Крім того, глюкани різної будови дуже різняться за ступенем розчинності у воді та органічних розчинниках. Хоча в окремих роботах вказується на вищу активність саме водних екстрактів плодових тіл *G. lucidum*, тому є сенс подальшого вивчення антимікробної активності екстрактів, отриманих з трутовика лакованого іншими методами екстракції.

Досить висока антагоністична активність вегетативного міцелію свідчить на користь доцільності більш детального вивчення його метаболітного спектру, враховуючи низьку собівартість та скорочені терміни отримання, у порівнянні з плодовими тілами.



**О. Ю. Зинченко, С. Л. Мирось**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,  
e-mail: farmikr@ukr.net, till2002@ukr.net

## **АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА МИЦЕЛИЯ И ЭКСТРАКТОВ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS) P. KARST.**

### **Реферат**

**Цель работы.** Определение влияния веществ непосредственно вегетативного мицелия и водных экстрактов плодовых тел двух штаммов *Ganoderma lucidum* на рост условно-патогенных микроорганизмов. **Материалы и методы.** Методом диффузии в агар определяли антимикробную активность вегетативного мицелия и водных экстрактов плодовых тел двух штаммов трютовика лакированного *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. ONU F101 и ONU F102. В качестве тест-объектов использовали штаммы бактерий *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и дрожжеподобных грибов *Candida albicans* ATCC 18804. **Результаты.** Установлено, что оба штамма трютовика при совместном культивировании с условно-патогенными микроорганизмами подавляют их рост. Активность водных экстрактов ниже по сравнению с мицелием. Разные по происхождению штаммы отличаются по уровню и спектру антимикробного действия. **Выводы.** Антимикробная активность штамма ONU F102 *G. lucidum* оказалась ниже чем, штамма ONU F101. Меньшую активность по сравнению с вегетативным мицелием показали водные экстракты.

**Ключевые слова:** *Ganoderma lucidum*, антимикробная активность, условно-патогенные микроорганизмы.

**O. Yu. Zinchenko, S. L. Miros**

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska St.,  
Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: farmikr@ukr.net, till2002@ukr.net

## **ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF MYCELIUM AND BASIDIOCARPS OF *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS) P. KARST.**

### **Summary**

**Aim.** Evaluation of the reishi mushroom, *Ganoderma lucidum*, vegetative mycelium and water extracts of basidiocarps influence on the growth of opportunistic microorganisms. **Materials and methods.** Antimicrobial activity of vegetative mycelium and water extracts of basidiocarps from two strains of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. ONU F101 and ONU F102 was screened by the agar diffusion method. Bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and yeast-like fungus *Candida*



*albicans ATCC 18804 were used as the test-objects. Results. It was established that both reishi mushroom strains are able to inhibit the growth of opportunistic microorganisms under cultivation. Activity of water extracts was lower than vegetative mycelium of the fungus. The strains of different origin differ by the level and range of antimicrobial activity. Conclusions. The antimicrobial activity of the ONU F102 G. lucidum strain was lower than the ONU F101's strain. The water extracts had less active activity compared with vegetative mycelium.*

*Key words: Ganoderma lucidum, antimicrobial activity, opportunistic microorganisms.*

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Автономова А. В. *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P.Karst., трутовик ларированный: штаммовое разнообразие, антибиотические свойства и противоопухолевое действие : автореф. дис. ... канд.биол. наук: 03.00.24. – Москва, 2006. – 32 с.
2. Вассер С. П. Наука о лекарственных грибах: современные перспективы, достижения и проблемы // Макромицеты: лекарственные свойства и биологические особенности. – Т. 2. – К.: Наш формат, 2016. – С. 7–40.
3. Дуденко Ю. Ю., Мірось С. Л., Іваниця В. О. Біологічно активні сполуки лікарського гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 2. – С. 6–19.
4. Зайченко Т. О., Круподьорова Т. А., Барштейн В. Ю., Дехтяренко Н.В. Антибактеріальні властивості деяких макромицетів // Проблеми біології та біотехнології. – 2017. – № 3. – С. 19-28.
5. Круподьорова Т. А., Бісько Н. А., Поєдинок Н. Л. та ін. Антимікробна активність штамів *Ganoderma applanatum* (Pers.: Wallr.) Pat. та *G. lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. в умовах глибинного культивування // Укр.ботан.журнал. – 2008. – 65, № 4. – С. 590–595.
6. *Макромицеты: лекарственные свойства и биологические особенности*. Т.2. Под ред. проф. И. Габриэля. – К.: Наш формат, 2016. – 261 с.
7. Мірось С. Л., Бобрешова Н. С., Дуденко Ю. Ю. Солома злакових культур – как альтернативный субстрат для выращивания *Ganoderma lucidum* в условиях юга Украины // Агротехнологии XXI века: концепции устойчивого развития: материалы международной конференции, посвященной 100-летию кафедры ботаники, защиты растений, биохимии и микробиологии (17-18 апреля 2014 г.). – Воронеж: ФГБОУ ВПО Воронежский ГАУ, 2014. – С. 112–116.
8. Мірось С. Л., Дуденко Ю. Ю., Бобрешова Н. С., Гудзенко Т. В., Іваниця В. О. Електрофоретичні спектри карбоксилестераз *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P.Karst. залежно від умов екстрагування та субстрату вирощування // Мікробіологія і біотехнологія. – № 2(18). – 2012. – С. 52–59.
9. Сафронова М. А., Титова Л. В. Феликсова Л. В. Антибиотическая активность грибов // Детские инфекции. – 2007. – Т. 6. – № 2. – С. 60–62.
10. Шариков А. М. Исследования антибактериальной активности метаболитов некоторых высших грибов // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 6. – С. 128–129.





11. Bao X. F, Zhen Y, Ruan L, Fang J. N. Purification, characterization, and modification of T-lymphocyte-stimulating polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2002. – № 50. – P. 623–629.

12. Cilerdžić J., Vukojević J., Stajić M., Stanojković T., Glamočlija J. Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate // J. Ethnopharmacol. – 2014. – № 155. – P. 309–312.

13. Kamble R., Venkata S. Gupte A. M. Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* mycelia // Journal of Pure and Applied Microbiology. – 2011. – № 5(2). – P. 983–986.

14. Lai C.Y., Hung J. T., Lin H. H., Yu A. L., Chen S. H., Tsai Y. C., Shao L.E., Yang W. B., Yu J. Immunomodulatory and adjuvant activities of a polysaccharide extract of *Ganoderma lucidum* in vivo and in vitro // Vaccine. – 2010. – № 12. – P. 4945–4954.

15. Lawal Temitope O., Wicks Sheila M., Mahady Gail B. *Ganoderma lucidum* (Ling-zhi): The Impact of Chemistry on Biological Activity in Cancer // Current Bioactive Compounds. – 2017. – № 13. – P. 28–40.

16. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive document // Clin Microbiol Infect. – 1998. – № 4. – P. 291–296.

17. Naveen kumar C, Jayalakshmi G, Chidambaram R, Srikumar R. In-vitro evaluation of antifungal activity of *Ganoderma lucidum* against the biofilm producing *Candida* species // Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. – 2017. – Vol. 51, Issue 4. – P. 623–630.

18. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement. M100-S9. – 1999. – № 19. – 38 p.

19. Nithya M., Ambikapathy V., Panneerselvam A. Studies on antimicrobial potential of different strains of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. Jul – Aug 2013. – 21(2), № 56. – P. 317–320.

20. Quereshi S., Pandey A. K., Sandhu S. S. Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts // People's J. of Scientific Research. – 2010 – 3(1) – P. 9–13.

21. Sánchez S., Demain A. L. Antibiotics: Current Innovations and Future Trends. – Caister Academic Press, 2015. – 416 p.

22. Xu Z., Chen X., Zhong Z., Chen L., Wang Y. *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities // J. Chin. Med. – 2011. – № 39. – P. 15–27.

## References

1. Avtonomova AV *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P.Karst., trutovik lakirovannyj: shtammovoe raznoobrazie, antibioticheskie svojstva i protivopuholevoe dejstvie : avtoref. dis. ... kand.biol. nauk: 03.00.24, Moskva,2006,32.

2. Vasser SP Nauka o lekarstvennyh gribah: sovremennye perspektivy, dostizhenija i problemi. *Makromicety: lekarstvennyje svojstva i biologicheskie osobennosti*. T.2, K.: Nash format, 2016, 7 – 40.



3. Dudenko YuYu, Miros' SL, Ivanytsya VO. Biologichno aktyvni spoluky likars'koho hryba *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr) P. Karst. *Mikrobiolohiya i biotekhnolohiya*, 2012, 2, 6-19.
4. Zajchenko TO, Krupod'orova TA, Barshtejn VJu, Dehtjarenko NV, Antibakterial'ni vlastivosti dejakih makromicetiv. *Problemi biologii ta biotekhnologii*, 2017, 3, 19 – 28.
5. Krupod'orova TA, Bis'ko NA, Poedinok NL ta in. Antimikrobna aktivnist' shtamiv *Ganoderma applanatum* (Pers.: Wallr.) Pat. ta *G. lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. v umovah glibinnogo kul'tivuvannja. *Ukr Botan J*, 2008, 65(4), 590 – 595.
6. *Makromicety: lekarstvennye svojstva i biologicheskie osobennosti*. T.2. Pod red. prof. I Gabrijelja, K.: Nash format, 2016, 261.
7. Miros SL, Bobreshova NS, Dudenko Yu Yu Soloma zlakovyih kultur – kak alternativnyiy substrat dlya vyiraschivaniya *Ganoderma lucidum* v usloviyah yuga Ukrainy *Agrotehnologii XXI veka: kontseptsii ustoychivogo razvitiya: materialyi mezhdunarodnoy konferentsii, posvyaschennoy 100-letiyu kafedryi botaniki, zaschityi rasteniy, biohimii i mikrobiologii (17-18 aprelya 2014 g.)* – Voronezh: FGBOU VPO Voronezhskiy GAU, 2014. – 112-116.
8. Miros' SL, Dudenko YuYu, Bobreshova NS, Hudzenko TV, Ivanytsya VO Elektroforetychni spektry karboksylesteraz *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P.Karst. zalezno vid umov ekstrahuvannya ta substratu vyroshchuvannya *Mikrobiolohiya i biotekhnolohiya*, 2012, 2(18), 52 – 59.
9. Safronova MA, Titova LV, Feliksova LV Antibioticheskaja aktivnost' gribov *Detskie infekcii*. 2007, 6(2), 60 – 62.
10. Sharikov AM. Issledovaniya antibakterial'noj aktivnosti metabolitov nekotoryh vysshih gribov. *Sovremennye naukoemkie tehnologii*, 2010; (6), 128 – 129.
11. Bao XF, Zhen Y, Ruan L, Fang JN Purification, characterization, and modification of T-lymphocyte-stimulating polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 50(5), 623 – 629.
12. Cilerdžić J, Vukojević J, Stajić M, Stanojković T, Glamočlija J Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate *J Ethnopharmacol* 2014,155(1), 309-312.
13. Kamble R., Venkata S, Gupte AM Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* mycelia *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2011, 5(2), 983-986.
14. Lai CY, Hung JT, Lin HH, Yu AL, Chen SH, Tsai YC, Shao LE, Yang WB, YuJ Immunomodulatory and adjuvant activities of a polysaccharide extract of *Ganoderma lucidum* in vivo and in vitro *Vaccine*, 2010, 12 (31), 4945-4954.
15. Lawal Temitope O, Wicks Sheila M, Mahady Gail B. *Ganoderma lucidum* (Ling-zhi): The Impact of Chemistry on Biological Activity in Cancer *Current Bioactive Compounds*, 2017, 13 (1), 28-40.
16. *Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents*. EUCAST Definitive document *Clin Microbiol Infect*, 1998, 4, 291 – 296.
17. Naveen kumar C, Jayalakshmi G, Chidambaram R, Srikumar R *In-vitro* evaluation of antifungal activity of *Ganoderma lucidum* against the biofilm



producing *Candida* species *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 2017, 51(4), 623-630.

18. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement. M100-S9, 1999, 19,(1), 38.

19. Nithya M., Ambikapathy V., Panneerselvam A. Studies on antimicrobial potential of different strains of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, Jul – Aug 2013, 21(2), 56, 317-320.

20. Sánchez S., Demain A. L. Antibiotics: Current Innovations and Future Trends. – Caister Academic Press, 2015. – 416 p.

21. Quereshi S., Pandey A. K., Sandhu S. S. Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts. *People's J. of Scientific Research.* , 2010; 3(1): 9 – 13

22. Xu Z., Chen X., Zhong Z., Chen L., Wang Y. *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities *Am J Chin Med.*, 2011, 39(1), 15-27.

Стаття надійшла до редакції 04.12.2017 р.



УДК 577.152.34/ 544.478.3

**І. І. Романовська<sup>1</sup>, О. В. Севастьянов<sup>1</sup>, Є. А. Шестеренко<sup>1</sup>,  
А. А. Крисько<sup>1</sup>, Ю. А. Шестеренко<sup>1</sup>, В. А. Топтіков<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України, Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна, (048)7659431, e-mail: romaigina@gmail.com

<sup>2</sup>Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

## **КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗИ ГОМОГЕНАТІВ ТРАВНИХ ЗАЛОЗ *RAPANA VENOSA***

**Мета:** Вивчити біохімічні і фізико-хімічні властивості карбоксилестераз гомогенатів стравохідної залози і гепатопанкреасу молюска *Rapana venosa*, особливості енантіоселективного ферментативного гідролізу естеру 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону, потенційного анксиолітичного і снодійного засобу. **Методи:** травні залози *Rapana venosa* гомогенізували і визначали вміст білка за методом Лоурі-Хартрі, естеразну активність за 1- і 2- нафтилацетатами. Ферментативний гідроліз естеру 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону проводили впродовж 2,5 год в розчині диметилсульфоксиду: Na-фосфатний буфер, 0,0167 М, рН 7,0, в об'ємних співвідношеннях 2:3, при температурі 37 °С. Визначення енантіомерного надлишку здійснювали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії, використовуючи систему SHIMADZU, що оснащена колонкою ChiraDex HR 5 $\mu$ m(4mm $\times$ 250mm). **Результати:** Показано, що естеразна активність гомогенатів гепатопанкреасу і стравохідної залози за 2-нафтилацетатом, як субстратом, в 3,6 рази та в 6,7 рази більша, ніж за 1- нафтилацетатом, відповідно. Належність естераз в гомогенатах до родини карбоксилестераз підтверджена повним пригніченням їх активності селективним інгібітором карбоксилестераз ди-(*n*-нітрофеніл)-фосфатом (2,0 ммоль/дм<sup>3</sup>). Показано, що рН-оптими естеразної активності гомогенатів стравохідної залози і гепатопанкреасу становлять 7,5, і 5,5, відповідно. Встановлено особливості гідролізу естеру 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону, що каталізується карбоксилестеразами у складі гомогенатів травних залоз *Rapana venosa*. Показано переважне утворення R-енантіомеру субстрату (енантіомерний надлишок R-енантіомеру становив 42%). **Висновки:** Виявлена регіоселективність відносно 1-, 2-нафтилацетатів та енантіоселективність карбоксилестераз естеру 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону.

**Ключові слова:** карбоксилестераза, травні залози *Rapana venosa*, регіоселективність, енантіоселективність.

Відомо, що чужорідні види можуть становити серйозну загрозу для біорізноманіття, сталого розвитку та охорони довкілля. *Rapana venosa* є хижим червононогим молюском і являє реальну небезпеку для водних екосистем Чорного моря, крім того, вона набула статусу виду світового розповсюдження

© І. І. Романовська<sup>1</sup>, О. В. Севастьянов<sup>1</sup>, Є. А. Шестеренко<sup>1</sup>, А. А. Крисько<sup>1</sup>, Ю. А. Шестеренко<sup>1</sup>, В. А. Топтіков<sup>2</sup>, 2018



[1,15]. Одже, перспективні біотехнологічні дослідження щодо використання даного молюска як нового економічного природного джерела сировини для отримання різноманітних біологічно активних речовин.

В літературі є дані про наявність карбоксилестеразної активності у молюсків (Mollusca) [5, 6, 9, 13], але роботи, присвячені вивченню карбоксилестераз молюска *Rapana venosa*, майже відсутні [15, 16].

Карбоксилестераза (КФ 3.1.1.1) ссавців є одним з найбільш досліджуваних ферментів, що застосовуються для отримання енантіомерів лікарських речовин. Карбоксилестераза має низку позитивних властивостей: широку субстрату специфічність і високу стереоселективність [3, 8], разом з тим недоліками застосування ферменту є висока вартість комерційного препарату. У зв'язку з цим актуальним є пошук більш доступних джерел отримання карбоксилестерази.

Відомо, що енантіомери мають однакові хімічні властивості, але можуть мати істотні відмінності у фармакологічних властивостях [12]. Сьогодні на світовому фармацевтичному ринку представлена достатня кількість лікарських препаратів, що випускаються у вигляді окремого енантіомеру. Їх перевагами є менша токсичність, та знижене дозування порівняно з рацематами [4].

Бенздіазепіни мають широкий спектр фармакологічних властивостей: анксиолітичні, гіпноседативні, протисудомні, міорелаксантні та ін. [11]. Тому пошук, синтез і дослідження фармакологічних властивостей нових представників бенздіазепінового ряду є актуальним завданням. Оскільки деякі з них є рацематами, а хімічні методи розділення пов'язані з низкою труднощів, перспективною є розробка доступніших біотехнологічних методів отримання енантіомерів.

Тому перспективним є дослідження карбоксилестеразної активності травних залоз (стравохідної залози і гепатопанкреасу) молюска *Rapana venosa* та визначення можливості застосування отриманих ферментних препаратів для здійснення енантіоселективного гідролізу естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону, потенційних анксиолітичних і снодійних засобів.

Метою роботи було виявити біохімічні і фізико-хімічні властивості карбоксилестераз гомогенатів стравохідної залози і гепатопанкреасу молюска *Rapana venosa* та особливості енантіоселективного ферментативного гідролізу естеру 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону.

### Матеріали та методи.

В роботі використовували *Rapana venosa*, зібрану в весняний період 2017 р. в районі Малого Фонтану в Одеській затоці і надану співробітниками кафедри генетики та молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова. Застосовували три вибірки по 10 молюсків з однаковим відношенням статей. З молюсків було виділено 2 травні залози: гепатопанкреас та стравохідна. Гомогенати готували на Na-фосфатному 0,0167 М буферному розчині, рН 7,0, при 10 ходах поршня і 1000 обертів за хвилину. У виділених гомогенатах визначали вміст білка за методом Лоурі в модифікації Хартрі [7], естеразну активність (за стандартними субстратами: 1- та 2-нафтилацетатами) [10].

Вплив селективного інгібітору карбоксилестераз ди-(*n*-нітрофеніл)-фос-



фату на ферментативну активність карбоксилестераз гомогенатів травних залоз визначали в діапазоні концентрацій 0,20–2,0 ммоль/дм<sup>3</sup>.

Вплив рН інкубаційного середовища на карбоксилестеразну активність гомогенатів вивчали в середовищі диметилсульфоксид: буферний розчин при рН 3,5–9,5;  $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Визначення температурного оптимуму карбоксилестеразної активності гомогенатів проводили в інтервалі  $t\ 20\text{--}75\text{ }^{\circ}\text{C}$  в умовах рН-оптимуму. Ступінь гідролізу 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-ону оцінювали за зменшенням кількості естерних груп спектрофотометрично гідроксаматним методом при  $\lambda\ 540\text{ нм}$  [17]. Ферментативний гідроліз 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-ону проводили протягом 2,5 годин в розчині диметилсульфоксид: Na-фосфатний буфер, 0,0167 М, рН 7,0, в об'ємних співвідношеннях 2:3, при температурі  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  до 50% трансформації естеру.

Виділення нетрансформованого енантіомеру вихідної сполуки з реакційного середовища після проведення гідролізу проводили екстракцією хлороформом з подальшим розділенням методом препаративної тонкошарової хроматографії (носій кізельгель 60 GF254, «Merck»). Визначення енантіомерного надлишку за допомогою ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія), використовуючи систему SHIMADZU (контролер системи CBM-20A; вакуумний дегазатор DGU-20 A5; насос високого тиску LC 20 AD UFLS, оснащений 4-канальним градієнтним блоком низького тиску; термостат колонок CTO-20A; діодно-матричний детектор SPDМ20A), що оснащена колонкою ChiraDex HR 5 $\mu\text{m}$  (4mm $\times$ 250mm). Енантіомерний надлишок розраховували за формулою:  $(\text{EH}) = (\text{частка енантіомера А} - \text{частка енантіомера В}) \times 100\%$ .

Дані експериментів піддавали статистичному опрацюванню та розраховували значення середньої стандартної похибки експерименту [2].

### Результати та їх обговорення

З молюска *Rapana venosa* отримані гомогенати стравохідної залози і гепатопанкреасу з вмістом білка  $317 \pm 1,4\text{ мг/г}$  тканини і  $292 \pm 16,1\text{ мг/г}$  тканини, відповідно. Дослідження естеразної активності показало, що естеразна активність гомогенатів гепатопанкреасу і стравохідної залози за 2-нафтилацетатом, як субстратом, в 3,6 рази та в 6,7 рази більша ніж за 1-нафтилацетатом, відповідно (рис. 1). Отримані дані свідчать про більшу регіоселективність карбоксилестераз травних залоз *Rapana venosa* до 2-нафтилацетату.

Належність естераз в гомогенатах травних залоз *Rapana venosa* до родини карбоксилестераз підтверджена повним пригніченням їх естеразної активності селективним інгібітором карбоксилестераз ди-(*p*-нітрофеніл)-фосфатом (2,0 ммоль/дм<sup>3</sup>) (рис. 2).

Було вивчено фізико-хімічні характеристики виділених гомогенатів для визначення оптимальних умов прояву максимальної активності (рис. 3 а,б). Встановлено, що рН-оптимум естеразної активності стравохідної залози становив 7,5; гепатопанкреасу – 5,5. Вивчення рН-профілю стравохідної залози виявило широкий діапазон збереження високої ферментативної активності (рН 3,5–8,0). Визначення термопрофілю активності гомогенатів показало, що термооптимум естеразної активності стравохідної залози становив  $37\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а гепатопанкреасу  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



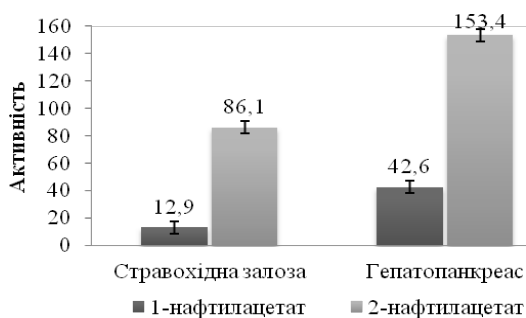


Рис. 1. Естеразна активність гомогенатів травних залоз *Rapana venosa* (нмоль нафтолу/мг білка за хв)

Fig. 1. Esterase activity of homogenates of *Rapana venosa* digestive glands (nmole of naphthol per mg protein per minute)

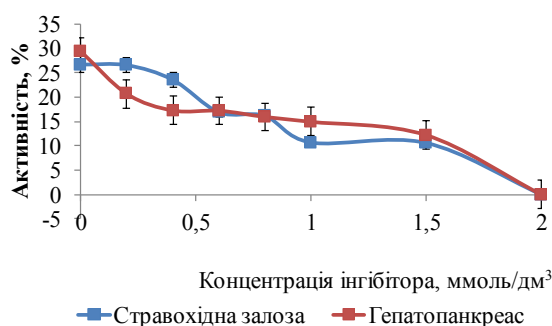


Рис. 2 Інгибування естеразної активності гомогенатів травних залоз *Rapana venosa* біс-(*p*-нітрофеніл)-фосфатом

Fig. 2. Inhibition of esterase activity of the digestive glands homogenates of *Rapana venosa* by bis-(*p*-nitrophenyl)-phosphate

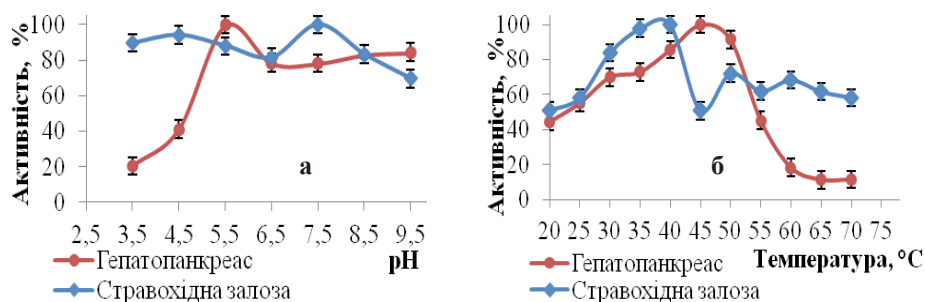


Рис. 3. Вплив рН (а) і температури (б) інкубаційного середовища на естеразну активність гомогенатів травних залоз *Rapana venosa*

Fig. 3. Effect of pH (a) and temperature (б) of the incubation medium on esterase activity of *Rapana venosa* digestive glands homogenates

Вперше нами було здійснено енантіоселективний гідроліз естеру 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою карбоксилестераз *Rapana venosa*. Об'єктом досліджень був 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он синтезований у відділі медичної хімії ФХІ імені О. В. Богатського НАН України [14]. З використанням гомогенатів стравохідної залози і гепатопанкреасу проведено енантіоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону з 50% ступенем трансформації (рис. 4).

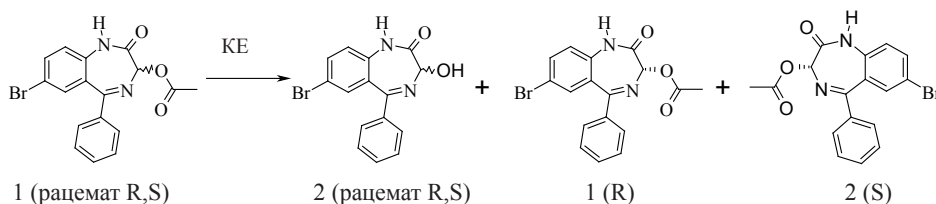


Рис. 4. Схема гідролізу субстрату гомогенатами травних залоз рапани *Rapana venosa* (KE – карбоксилестерази)

Fig. 4. Scheme of the substrate hydrolysis by *Rapana venosa* digestive glands homogenates

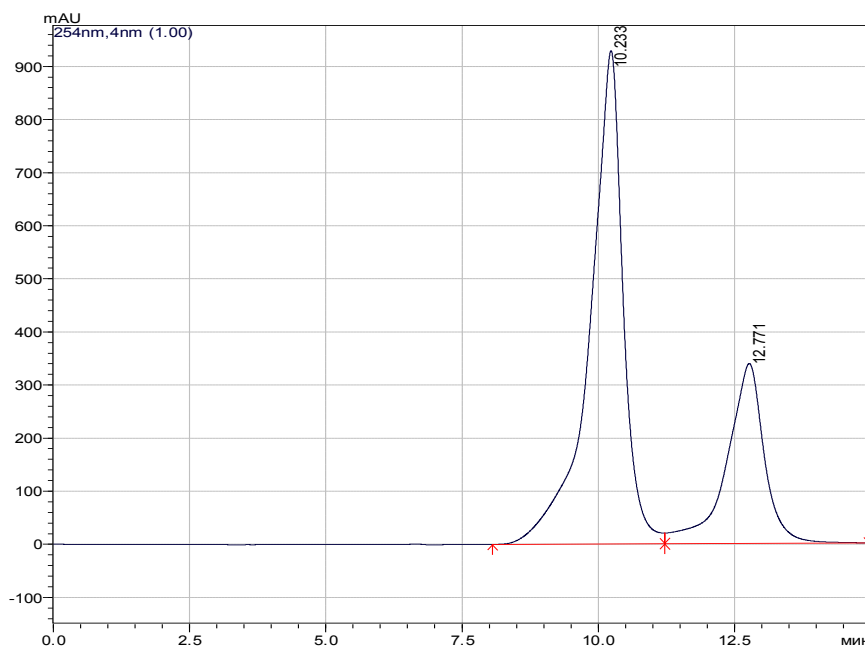


Рис. 5. Хроматограма енантімерів 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідрів 3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону після гідролізу з використанням гомогенатів травних залоз *Rapana venosa*

Fig. 5. Chromatogram of 3-acetoxy-5-phenyl-7-bromo-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one enantiomers after hydrolysis with using *Rapana venosa* digestive glands homogenates





В результаті гідролізу утворюється відповідне 3-гідроксипохідне (сполука 2), структура якого підтверджена методом мас-спектрометрії. Відомо, що сполука 2 піддається швидкій рацемізації в умовах інкубаційного середовища [14]. Методом ВЕРХ нами встановлена присутність двох енантіомерів естеру 1 (рис. 5) в співвідношенні R:S = 71:29 при використанні карбоксилестераз гомогенатів обох травних залоз. Тобто енантіомерний надлишок R-енантіомеру становив 42 %.

Переважає R-енантіомеру в суміші свідчить про більшу специфічність карбоксилестераз гомогенатів гепатопанкреасу і стравохідної залози до S-енантіомеру субстрату.

Показана більша активність естераз гомогенатів стравохідної залози *Rapana venosa* у кислому середовищі (рН 3,5–5,5) та за високих температур (55–70 °С), ніж така гепатопанкреасу. Доведено приналежність досліджуваних ензимів гомогенатів стравохідної залози та гепатопанкреасу до родини карбоксилестераз. Встановлено, що естеразна активність травних залоз гомогенатів *Rapana venosa*, визначена за 2-нафтилацетатом, перевищує таку за 1-нафтилацетатом в 3,6 та в 6,7 раз, відповідно. В гідролізі 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону з використанням гомогенатів травних залоз *Rapana venosa* показано переважне утворення R-енантіомеру субстрату (енантіомерний надлишок R-енантіомеру становив 42 %).

**И. И. Романовская<sup>1</sup>, О. В. Севастьянов<sup>1</sup>, Е. А. Шестеренко<sup>1</sup>,  
А. А. Крысько<sup>1</sup>, Ю. А. Шестеренко<sup>1</sup>, В. А. Топтиков<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Физико-химический институт имени А. В. Богатского НАН Украины,  
Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080, Украина, тел.: +38 (048) 765 94 31,  
e-mail: romairina@gmail.com

<sup>2</sup>Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,  
Одесса, 65082, Украина

## КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗЫ ГОМОГЕНАТОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗ *RAPANA VENOSA*

### Реферат

**Цель.** Исследование биохимических и физико-химических свойств карбоксилэстераз гомогенатов пищеводной железы и гепатопанкреаса моллюска *Rapana venosa*, изучение особенностей энантиоселективного ферментативного гидролиза сложного эфира 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она, потенциального анксиолитического и снотворного средства. **Методы.** Пищеварительные железы *Rapana venosa* гомогенизировали для дальнейших исследований и определяли содержание белка по методу Лоури-Хартри, эстеразную активность по 1- и 2- нафтилацетатам. Ферментативный гидролиз сложного эфира 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она, проводили в течение 2,5 ч в растворе диметилсульфоксид: Na-фосфатный буфер, 0,0167 М, рН 7,0, в объемных соотношениях 2:3, при температуре 37 °С. Определение энантиомерного избытка осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, используя систему SHIMADZU, оснащенную колонкой ChiraDex HR 5 $\mu$ m (4mm  $\times$  250mm). **Результаты.** Впер-



вые показано, что эстеразная активность гомогенатов гепатопанкреаса и пищеводной железы по 2-нафтилацетату, в качестве субстрата, в 3,6 раза и в 6,7 раза больше, чем по 1-нафтилацетату, соответственно. Принадлежность эстераз в гомогенатах к семейству карбоксилэстераз подтверждена полным подавлением их активности селективным ингибитором карбоксилэстераз ди-(*p*-нитрофенил)фосфатом (2,0 ммоль/дм<sup>3</sup>). Показано, что рН-оптимумы эстеразной активности гомогенатов пищеводной железы и гепатопанкреаса составляют 7,5, и 5,5, соответственно. Изучены особенности гидролиза сложного эфира 3-гидрокси-1,4-бензодиазепин-2-она, катализируемого карбоксилэстеразами в составе гомогенатов пищеварительных желез *Rapana venosa*. Показано преимущественное образование *R*-энантиомера субстрата (энантиомерный избыток *R*-энантиомера составил 42 %). **Выводы.** Выявлена региоселективность относительно 1-, 2-нафтилацетатов и энантиоселективность карбоксилэстераз сложного эфира 3-гидрокси-1,4-бензодиазепин-2-она.

*Ключевые слова:* карбоксилэстераза, пищеварительные железы *Rapana venosa*, региоселективность, энантиоселективность.

**I. I. Romanovska<sup>1</sup>, O. V. Sevastyanov<sup>1</sup>, Ye. A. Shesterenko<sup>1</sup>,  
A. A. Krysko<sup>1</sup>, Yu. A. Shesterenko<sup>1</sup>, V. A. Topnikov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine, 86, Lustdorfska road, Odesa, Ukraine, tel.: +38 (048)765 94 31, e-mail: romairina@gmail.com

<sup>2</sup> Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska St., Odesa, 65082, Ukraine

## **CARBOXYLESTERASES OF *RAPANA VENOSA* DIGESTIVE GLANDS HOMOGENATES**

### **Summary**

**Aim.** Investigation of biochemical and physico-chemical properties of carboxylesterases in homogenates gland and hepatopancreas of *Rapana venosa*; study of the features of enantioselective enzymatic hydrolysis of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-2-one ester, potential anxiolytic and hypnotic drug. **Methods.** Digestive glands of *Rapana venosa* were homogenized for subsequent investigations, the protein content in them was determined by the Lowry-Hartree method and esterase activity – according to 1-, 2-naphthyl acetates. Enzymatic hydrolysis of 3-hydroxy-5-phenyl-7-bromo-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one was conducted for 2,5 h in the solution: dimethyl sulfoxide: Na-phosphate buffer 0,0167 M, pH 7,0 in volume ratio 2:3, at 37 °C. Determination of enantiomeric excess was conducted with help of high performance liquid chromatography in SHIMATSU system, equipped with ChiraDex HR 5µm(4mm×250mm) column. **Results.** For the first time it was shown, that esterase activity of hepatopancreas and esophageal gland homogenates for 2-naphthyl acetate as substrate, was 3,6-fold and 6,7-fold greater, than for 1-naphthyl acetate, respectively. The belonging of esterases in homogenates to the family of carboxylesterase was confirmed by the total suppression of their activity by the selective carboxylesterase inhibitor; di-(*p*-nitrophenyl)phosphate (2.0 mmol/dm<sup>3</sup>). It was shown, that pH-optima of esterase activity in homogenates of esophageal gland and hepatopancreas equals 7,5 and 5,5, respectively. The features of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-



2-one ester hydrolysis, catalyzed by carboxylesterase of *Rapana venosa* digestive glands homogenates were studied. The preferential formation of the R-enantiomer of substrate was shown (enantiomeric excess of R- enantiomer was 42%).

**Conclusion.** The regioselectivity of carboxylesterase to 1-, 2-naphtyl acetates and enantioselectivity of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-2-one ester were found.

*Key words:* carboxylesterase, digestive glands of *Rapana venosa*, regioselectivity, enantioselectivity.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Топтіков В. А., Ковтун О. О., Алексєєва Т. Г.* Морфологія та фізіологія червоногого моллюска *Rapana venosa*. Навчально-методичний посібник. – Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2014. – 68 с.
2. *Ланач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
3. *Шестеренко Е. А., Романовская И. И., Севастьянов О. В., Андронати С.А.* Карбоксилэстеразы в энантиоселективном синтезе органических соединений // *Biotechnologia Acta.* – 2013. – Т. 6, № 1. – С. 9–21.
4. *Calcaterra A., D'Acquarica I.* The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds // *J. Pharm. Biomed. Anal.* –2018. – V. 147. – P. 323–340.
5. *Douhri H., Sayah F.* The use of enzymatic biomarkers in two marine invertebrates *Nereis diversicolor* and *Patella vulgata* for the biomonitoring of Tangier's bay (Morocco) // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* –2009. – V. 72, № 2. – P. 394–399.
6. *Browne M. A., Dissanayake A., Galloway T. S.* Organophosphorous biocides reduce tenacity and cellular viability but not esterase activities in a non-target prosobranch (limpet) // *Env. Pollution.* – 2015. – V. 203, № 4. – P. 208–213.
7. *Hartree E. F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* – 1972. – V. 48, № 1. – P. 422–427.
8. *Hosokawa M.* Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs // *Molecules.* – 2008. – V. 13, № 2. – P. 412–431.
9. *MacKenzie L. A., Selwood A. I., Marshall C.* Isolation and characterization of an enzyme from the Greenshell™ mussel *Perna canaliculus* that hydrolyses pectenotoxins and esters of okadaic acid // *Toxicon.* – 2012. – V. 60, № 3. – P. 406–419.
10. *Mohie M. K., E. D. Sharaf, A. M. Khalid, et al.* Colorimetric determination of simvastatin and lovastatin in pure form and in pharmaceutical formulations // *Spectrochim. Acta, Part A.* – 2010. – V. 76. – P. 406–419.
11. *Mozayani A., Raymon L. P.* Handbook of Drug Interactions. A clinical and forensic guide. –New York, Totowa: Humana Press Inc, 2004. – 663 p.
12. *Patel R. N.* Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals // *Bioorg. Med. Chem.* – 2018. – V. 26, № 7. – P. 252–1274.



13. Reguera P., Couceiro L., Fernandez N. A review of the empirical literature on the use of limpets *Patella* spp. (Mollusca: Gastropoda) as bioindicators of environmental quality // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* –2018. – V. 48, № 2. – P. 593–600.
14. Shesterenko Ye. A., Romanovska I. I., Sevastyanov O. V., Andronati S. A., Pavlovsky V. I., Yurpalova T. A., Wicher B., Kravtsov V. Ch., Krysko A. A. Enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-one esters by pig liver microsomes // *J. Mol. Catal. B. Enzym.* – 2014. – V. 102. – P. 27–33.
15. Toptikov V. A., Totsky V. N., Aleksieieva T. G., Kovtun O. A. Hydrolytic enzymes expressivity in different parts of the *Rapana* digestive system // *Ukr. Biochem. J.* – 2016, V. 88, № 3. – P. 5–17.
16. Toptikov V. A., Alekseyeva T. G., Kovtun O. O. Hydrolytic enzymes in *Rapana venosa* digestive system.– Saarbrücken: LAP LAMBERT Academi Publishing, 2017. – 65 p.
17. Yang K., Lu X. Racemization kinetics of enantiomeric oxazepam: stereoselective hydrolysis of enantiomeric oxazepam 3-acetate in rat liver microsomes and brain homogenate // *J. Pharm. Sci.* – 1989. – V. 78, № 10. – P. 789–795.

#### Referens

1. Toptikov VA, Kovtun OO, Alexeeva TG. Morfolohiia ta fiziolohiia cherevonohoho molyuska *Rapana venosa*. Navchalno-metodychnyi posibnyk. – Odesa: Odeskyi natsionalnyi universytet imeni I.I. Mechnykova, 2014, 68 p.
2. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskiye metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniyem Excel. – K.: Morion, 2000. – 320 p.
3. Shesterenko EA, Romanovskaya II, Sevastyanov OV, Andronati SA. Karboksilesterazy v enantiosektivnom sinteze organicheskikh soyedineniy. *Biotechnologia Acta.* 2013;6(1):9-21.
4. Calcaterra A, D'Acquarica I. The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018;147:323-340.
5. Duhri H, Sayah F. The use of enzymatic biomarkers in two marine invertebrates *Nereis diversicolor* and *Patella vulgata* for the biomonitoring of Tangier's bay (Morocco). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2009;72(2):P. 394-399.
6. Browne MA, Dissanayake A, Galloway TS. Organophosphorous biocides reduce tenacity and cellular viability but not esterase activities in a non-target prosobranch (limpet). *Env. Pollution.* 2015;203(4):P. 208-213.
7. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 1972;48(1):P. 422-427.
8. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs. *Molecules.* 2008;13(2):412–431.
9. MacKenzie LA, Selwood AI, Marshall C. Isolation and characterization of an enzyme from the Greenshell™ mussel *Perna canaliculus* that hydrolyses pectenotoxins and esters of okadaic acid. *Toxicon.* 2012;60(3):406-419.



10. Mohie MK, Sharaf ED, Khalid AM et al. Colorimetric determination of simvastatin and lovastatin in pure form and in pharmaceutical formulations. *Spectrochim. Acta, Part A*. 2010;76:406-419.

11. Mozayani A, Raymon LP. *Handbook of Drug Interactions. A clinical and forensic guide*. New York, Totowa: Humana Press Inc, 2004, 663 p.

12. Patel RN. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorg. Med. Chem.* 2018;26(7):1252-1274.

13. Reguera P, Couceiro L, Fernandez N. A review of the empirical literature on the use of limpets *Patella* spp. (Mollusca: Gastropoda) as bioindicators of environmental quality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018;48(2):593-600.

14. Shesterenko YeA, Romanovska II, Sevastyanov OV, Andronati SA, Pavlovsky VI, Yurpalova TA, Wicher B, Kravtsov VCh, Krysko AA. Enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-one esters by pig liver microsomes. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 2014;102:P. 27-33.

15. Toptikov VA, Totsky VN, Aleksieieva TG, Kovtun OA. Hydrolytic enzymes expressivity in different parts of the *Rapana* digestive system. *Ukr. Biochem. J.* 2016;88(3):5-17.

16. Toptikov VA, Alekseyeva TG, Kovtun OO. *Hydrolytic enzymes in Rapana venosa digestive system*. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academi Publishing, 2017. 65 p.

17. Yang K, Lu X. Racemization kinetics of enantiomeric oxazepam: stereoselective hydrolysis of enantiomeric oxazepam 3-acetate in rat liver microsomes and brain homogenate. *J. Pharm. Sci.* 1989;78(10):789-795.

Стаття надійшла до редакції 03.05.2018 р.



УДК 579.695

**О. Г. Горшкова, Т. В. Гудзенко, О. В. Волювач,  
І. П. Конуп, Т. О. Беляєва**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна; тел.: +38 (068) 259 33 08,  
e-mail: tgudzenko@ukr.net

## **ОЧИЩЕННЯ ВОДИ ВІД ФЕНОЛУ ТА ЙОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ АСОЦІАЦІЄЮ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS***

**Мета.** Очищення води від фенолу та йонів важких металів з використанням бактерій роду *Pseudomonas*. **Методи.** Ефективність мікробного очищення оцінено за ступенем вилучення із води циклічних ароматичних сполук - фенолу і важких металів [Pb (II), Cd(II), Zn (II)]. Концентрацію фенолу визначали екстракційно-фотометричним методом з використанням 4-аміноантпірину; важких металів - атомно-абсорбційним методом на полум'яному атомно-абсорбційному спектрофотометрі "Сатурн" в полум'ї суміші "повітря - пропан - бутан". **Результати.** Для очищення води від фенолу і йонів важких металів використано штами *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327. Встановлено, що за дії окремих штамів мікроорганізмів у кількості  $7,5 \times 10^5$  КУО/мл протягом 18–22 діб (залежно від обраного штаму) відбувається повне знефенолення водних розчинів. При використанні асоціації штамів *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327 (1:1:1 в об'ємному співвідношенні) час глибокого очищення води від фенолу з вихідною концентрацією у воді 300 мг/дм<sup>3</sup> скорочується до 10 діб. Ступінь вилучення Pb(II), Cd(II), Zn(II) із концентрованих розчинів окремими штамами мікроорганізмів у складі біофлорів сягав 95,00–99,95% при залишковому вмісті йонів важких металів у розчині (0,03–1,0) мг/дм<sup>3</sup>. Використання асоціації штамів *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327 забезпечує найбільшу ефективність очищення води від катіонів важких металів. За обробки металовмісних розчинів іммобілізованими у складі біофлор клітинами бактеріальної асоціації залишкова концентрація Pb (II), Cd (II), Zn (II) складає  $0,03 \pm 0,001$ ,  $0,02 \pm 0,001$  і  $0,03 \pm 0,004$  мг/дм<sup>3</sup> відповідно, що не перевищує гранично-допустимої їх концентрації в очищених водах для скидання у каналізацію. **Висновок.** Використані штами бактерій роду *Pseudomonas* характеризуються поліфункціональним потенціалом біотехнологічного призначення – деструктивним щодо фенолу та сорбційно-акумулювальним щодо йонів важких металів, що розкриває перспективи їх використання в комплексній біотехнології очищення навколишнього середовища від полутантів різної природи.

*Ключові слова:* мікробне очищення води, фенол, йони важких металів, асоціація бактерій роду *Pseudomonas*.



Скидання стічних вод медичних закладів, виробництва фармацевтичних препаратів, гірничопромислових комплексів призводить до забруднення поверхневих водних об'єктів різними токсичними хімічними забруднювачами: фенольними сполуками, йонами важких металів тощо [3, 8]. Фенольні сполуки, а також йони важких металів Pb, Cd, Ni, Zn тощо, які надходять у навколишнє середовище із шахтними водами і стоками рудозбагачувальних фабрик, відносяться до токсичних забруднювачів [2, 10]. Відомо, що йони важких металів становлять реальну небезпеку для здоров'я людини і стають істотною перешкодою у життєдіяльності більшості мікробіонтів [1, 6].

Тому на сьогоднішній день основною екологічною проблемою є впровадження сучасних ефективних методів очищення техногенно небезпечних стоків; зниження рівня скидів хімічних речовин, що забруднюють довкілля у процесі їх виробництва, та вжиття заходів щодо запобігання аварійним ситуаціям, пов'язаним із залповими та раптовими викидами і скидами, своєчасне проведення ремедіації водних об'єктів.

Підвищення вимог до якості води та допустимих концентрацій забруднень в промислових стічних водах, зумовлює необхідність шукати нові, екологічно чисті та економічно вигідні способи видалення з них поллютантів різної природи. До таких методів, які успішно застосовуються для рішення цієї проблеми і є достатньо ефективними, можна віднести біологічні методи [7, 9, 11]. Біодеструкція органічних поллютантів, детоксикація металовмісної води мікроорганізмами є альтернативою більш вартісним і іноді менш ефективним фізико-хімічним технологіям, застосування яких потребує громіздкого складного обладнання і значних витрат електроенергії [4, 5].

*Мета даної роботи* полягала в очищенні води від фенолу та йонів важких металів з використанням бактерій роду *Pseudomonas*.

### Матеріали та методи

Для проведення дослідження використовували штами бактерій роду *Pseudomonas*: *P. cepacia* ONU327 (виділений із ґрунту), *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 (виділені з морської води), що зберігаються в колекції непатогенних мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова.

Для мікробного очищення води від фенолу та йонів важких металів бактерії попередньо нарощували у живильному середовищі складу (г/дм<sup>3</sup>): КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 1,5; Na<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> – 3; NaCl – 5; NH<sub>4</sub>Cl – 1; пептони – 10; глюкоза – 2; дріжджовий екстракт – 5. Нарощування біомаси здійснювали при рН 7,0–7,2 і температурі 28 °С протягом 48 год до досягнення щільності культур не менше 5 г/дм<sup>3</sup> за сухою біомасою. Приготовану бактеріальну асоціацію (біореагент), складену із штамів *P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 (1:1:1 за об'ємом) змішували із забрудненою водою та при підвищенні ступеня очищення води від неорганічних поллютантів (йонів важких металів) вводили свіжоприготовані водні розчини Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> (3%) і СаСl<sub>2</sub> (10%). Під дією перекису водню і хлориду кальцію суттєво пришвидшувався процес утворення в однорідній суспензії біофлорів (за відсутності хімреагентів агрегація бактерій протікає значно повільніше і відбувається під дією поліцукрид-



них комплексів клітинної стінки). При цьому різко збільшувалася загальна адсорбційна ємність системи і, відповідно, ефективність очищення води від свинцю, кадмію та цинку (які в переважній кількості містяться у відпрацьованих розчинах гірничо-видобувної промисловості).

Ефективність очищення води від поллютантів різної природи оцінювали за ступенем очищення ( $\alpha, \%$ ), розрахованим за рівнянням:

$$\alpha = [C_0 - C] / C_0 \times 100\%$$

де  $C_0$  і  $C$  – концентрації поллютанту у воді до та після мікробіологічної очистки.

Концентрацію фенолу визначали екстракційно-фотометричним методом з використанням 4-аміноантипірину; важких металів – атомно-абсорбційним методом на полум'яному атомно-абсорбційному спектрофотометрі "Сатурн" в полум'ї суміші "повітря – пропан – бутан".

Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95% ( $p \leq 0,05$ ). Обробку даних здійснювали з використанням програми «Microsoft Office Excel 2003».

### Результати досліджень та їх обговорення

Експериментально підтверджено ефективність очищення води від високотоксичного фенолу за дії окремих штамів бактерій роду *Pseudomonas* та їх асоціації. Результати по очищенню води від фенолу (з вихідною концентрацією 300 мг/дм<sup>3</sup>) за дії окремих штамів мікроорганізмів *P. ceracia* ONU-327, *P. fluorescens* ONU-328 і бактеріальної асоціації *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 (1:1:1 за об'ємом), отримані при температурі 30 °С, представлені на рис. 1.



Рис. 1. Ступінь очищення води від фенолу (%) протягом часу (t, доба) за дії окремих штамів *P. ceracia* ONU327 (1); *P. fluorescens* ONU328 (2), *P. maltophilia* ONU329 (3) та бактеріальної асоціації *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 (1:1:1 за об'ємом) (4).

Примітки: \* початкова концентрація фенолу – 300 мг/дм<sup>3</sup>; концентрація бактеріальних клітин –  $7,5 \times 10^5$  КУО/мл

Fig. 1. The degree of water purification from phenol (%) for time (t, day) in presence of individual strains of *P. ceracia* ONU327 (1); *P. fluorescens* ONU328 (2) and bacterial association *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 and *P. maltophilia* ONU329 (1: 1: 1 by volume) (3).

Notes: \* initial concentration of phenol – 300 mg/dm<sup>3</sup>; the concentration of bacterial cells is  $7.5 \times 10^5$  CFU/ml





При введенні в забруднену воду штамів *P. ceracia* ONU327 в кількості  $7,5 \times 10^5$  КУО/мл ступінь очищення води від фенолу на 10 добу сягав  $\sim 45\%$ ; використання штаму *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 підвищувало ефективність знефенолення води до  $78\%$  і  $93\%$  відповідно (рис. 1). Введення у забруднену фенолом воду бактеріальної асоціації дозволяє дещо прискорити процес біодеструкції фенолу; що супроводжувалося за такий самий період 10 діб підвищенням ефективності очищення води від фенолу до  $100\%$ . Варто зазначити, що аналогічну високу ефективність знефенолення стічних вод коксохімічних заводів шляхом використання фенол-деструктивних мікроорганізмів підтверджено Путиліною Н.Т. [4, 5].

Експериментально встановлено, що штами бактерій *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 виявляють стійкість до порівняно високих концентрацій катіонів важких металів: Pb (II), Cd (II), Zn (II). Встановлено для окремих йонів важких металів (ІВМ) їх концентрації, що є "пороговими" для досліджуваних штамів мікроорганізмів: Pb (II) –  $60 \text{ мг/дм}^3$ ; Cd (II) –  $50 \text{ мг/дм}^3$ ; Zn (II) –  $20 \text{ мг/дм}^3$  (табл. 1, 2).

Таблиця 1

**Ефективність очищення води від Pb (II), Cd(II), Zn (II) вільними клітинами бактерій роду *Pseudomonas***

Table 1

**Efficiency of water purification from Pb (II), Cd (II), Zn (II) by bacteria cells of the genus *Pseudomonas***

Ефективність очищення води від ІВМ	Штам			
	<i>P. fluorescens</i> ONU328	<i>P. maltophilia</i> ONU329	<i>P. ceracia</i> ONU327	<i>P. ceracia</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. maltophilia</i>
Залишкова концентрація Pb (II), $\text{мг/дм}^3$	$4,1 \pm 0,65$	$2,8 \pm 0,15$	$1,3 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,03$
Ступінь вилучення Pb (II), %	93,2	95,3	97,8	99,6
Залишкова концентрація Cd (II), $\text{мг/дм}^3$	$5,2 \pm 0,70$	$9,5 \pm 0,90$	$6,1 \pm 0,45$	$4,8 \pm 0,70$
Ступінь вилучення Cd (II), %	89,6	81,0	87,8	90,4
Залишкова концентрація Zn (II), $\text{мг/дм}^3$	$9,3 \pm 0,80$	$3,2 \pm 0,50$	$12,2 \pm 1,20$	$3,0 \pm 0,70$
Ступінь вилучення Zn (II), %	53,5	84,0	39,0	85,0

Примітки: \* –  $p \leq 0,05$ ; вихідні концентрації йонів важких металів у воді: Pb (II) –  $60 \text{ мг/дм}^3$ ; Cd (II) –  $50 \text{ мг/дм}^3$ ; Zn (II) –  $20 \text{ мг/дм}^3$ ; рН обробки води 6,8–7,2.

Notes: \* –  $p \leq 0,05$ ; initial concentration of heavy metal ions in water: Pb (II) –  $60 \text{ mg/dm}^3$ ; Cd (II) –  $50 \text{ mg/dm}^3$ ; Zn (II) –  $20 \text{ mg/dm}^3$ ; pH of water treatment 6,8–7,2.



Таблиця 2

Ефективність очищення води від Pb (II), Cd(II), Zn (II) іммобілізованими у складі біофлокул клітинами бактерій роду *Pseudomonas*

Table 2

Efficiency of water purification from Pb (II), Cd (II), Zn (II) immobilized in bioflocal cells by bacteria of the genus *Pseudomonas*

Ефективність очищення води від ІВМ	Штам			
	<i>P. fluorescens</i> ONU328	<i>P. maltophilia</i> ONU329	<i>P. ceracia</i> ONU327	<i>P. ceracia</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. maltophilia</i>
Залишкова концентрація Pb (II), мг/дм <sup>3</sup>	0,05±0,002	0,05±0,002	0,03±0,003	0,03±0,001
Ступінь вилучення Pb (II), %	99,92	99,92	99,95	99,95
Залишкова концентрація Cd (II), мг/дм <sup>3</sup>	0,14±0,05	0,88±0,07	0,24±0,05	0,02±0,001
Ступінь вилучення Cd (II), %	99,72	98,24	99,52	99,96
Залишкова концентрація Zn (II), мг/дм <sup>3</sup>	0,08±0,012	0,03±0,004	1,0±0,08	0,03±0,004
Ступінь вилучення Zn (II), %	99,60	99,85	95,00	99,85

Примітки: \* –  $p \leq 0,05$ ; вихідні концентрації іонів важких металів у воді: Pb (II) – 60 мг/дм<sup>3</sup>; Cd (II) – 50 мг/дм<sup>3</sup>; Zn (II) – 20 мг/дм<sup>3</sup>; pH обробки води 6,8–7,2  
Notes: \* –  $p \leq 0,05$ ; initial concentration of heavy metal ions in water: Pb (II) – 60 mg/dm<sup>3</sup>; Cd (II) – 50 mg/dm<sup>3</sup>; Zn (II) – 20 mg/dm<sup>3</sup>; pH of water treatment 6,8–7,2

Особливо високу сорбційно-акумулявальну здатність усі досліджувані штами мікроорганізмів виявляли щодо Pb (II). Так, при обробці Pb-вмісних водних розчинів вільними клітинами бактерій роду *Pseudomonas* ступінь очищення залежно від штаму був у межах від 93,2% до 97,8% залежно від використаного штаму мікроорганізму, і був максимальним за дії вільних клітин штаму *P. ceracia* ONU327. Використання асоціації штамів бактерій *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 (в об'ємному співвідношенні 1:1:1) хоча і сприяло незначному підвищенню ступеня очищення води від Pb (II) до 99,6% порівняно із обробкою вільними клітинами штаму *P. ceracia* ONU327 (97,8%), однак залишкова концентрація Pb (II) у воді  $0,25 \pm 0,03$  мг/дм<sup>3</sup> не відповідала нормі гранично-допустимої концентрації (ГДК) для скидання такої води у каналізацію. Аналогічний результат спостерігався і при вилученні Cd (II), Zn (II) із водних розчинів: на виході очищувальної системи концентрація важких металів була значно вищою за ГДК, навіть за дії асоціації штамів *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329, за якої спостерігався синергетичний ефект щодо метал-акумулявальної здатності. Однак, слід, підкреслити: до іонів важких металів, що відносяться до I класу токсичності [Pb (II), Cd (II)] усі штами



мікроорганізмів виявляли більшу метал-акумулювальну здатність, ніж до Zn (II). Найбільша Zn-акумулювальна здатність спостерігалася лише у штаму *P. maltophilia* ONU329. За обробки Zn-вмісних розчинів вільними клітинами штаму *P. maltophilia* ONU329 концентрація Zn (II) зменшувалася з 20 мг/дм<sup>3</sup> до 3,2±0,50 мг/дм<sup>3</sup> при досягненні ступеня очищення води 84%.

При мікробному очищенні металовмісних розчинів за відсутності хімічних реагентів (перекису водню та хлориду кальцію) агрегація бактерій протікала дуже повільно від 60 до 90 хвилин і відбувалася під дією поліцукридних комплексів їх клітинних стінок. Під впливом хімічних реагентів значно пришвидшувався (до 15–20 хвилин) процес утворення у воді бактеріальних агрегатів – біофлокул. При цьому різко збільшувалася загальна адсорбційна ємність системи і, відповідно, ефективність очищення води від ІВМ, особливо від Zn (II) (табл. 2). Результати по очищенню води від йонів важких металів Pb (II), Cd (II), Zn (II), іммобілізованими у складі біофлокул клітинами бактерій роду *Pseudomonas* представлені в табл. 2.

Як видно із даних табл. 2, очищення металовмісних розчинів за дії іммобілізованих у складі біофлокул клітин *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. ceracia* ONU327 є досить ефективним щодо вилучення небезпечних для людини і навколишнього середовища йонів важких металів. Ступінь вилучення Pb (II), Cd (II), Zn (II) із концентрованих розчинів окремими штамми мікроорганізмів сягав 95,00–99,95% при залишковому вмісті йонів важких металів у розчині 0,03–1,0 мг/дм<sup>3</sup>. Використання асоціації штамів бактерій роду *Pseudomonas* в попередньому очищенні металовмісних розчинів забезпечує найбільшу ефективність (див. табл. 2). При цьому залишкова концентрація Pb (II), Cd (II), Zn (II) знаходиться у межах 0,02–0,03 мг/дм<sup>3</sup>, що значно нижче або на рівні їх гранично-допустимої концентрації (ГДК) для скидання очищених розчинів у каналізацію: Pb (II) – 0,03 мг/дм<sup>3</sup>; Cd (II) – 0,02 мг/дм<sup>3</sup>; Zn (II) – 1,0 мг/дм<sup>3</sup>.

Експериментально підтверджено, що на відміну від аналогічного способу [11] кожен з штамів бактерій роду *Pseudomonas*: *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. ceracia* ONU327 та їх асоціація (1:1:1) володіє сорбційно-акумулювальною дією і щодо Cr (VI) [12].

Використані при очищенні забрудненої води штамми бактерій роду *Pseudomonas* поряд із високою адсорбційно-акумулювальною здатністю щодо ІВМ також виявляють підвищений деструктивний потенціал щодо токсичних фенольних сполук і вуглеводнів нафти [13], що розкриває межі їх використання в біотехнології очищення навколишнього середовища від різних хімічних забруднювачів.

Встановлено, що за дії окремих штамів бактерій роду *Pseudomonas* у кількості 7,5×10<sup>5</sup> КУО/мл протягом 18–22 діб (залежно від обраного штаму) відбувається повне знефенолення водних розчинів. При використанні асоціації штамів час глибокого очищення води від фенолу з вихідною концентрацією у воді 300 мг/дм<sup>3</sup> скорочується до 10 діб.

Рекомендовано використовувати асоціацію штамів *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 і *P. ceracia* ONU327 як більш ефективний біосорбент і біоаккумулятор йонів важких металів, які перебувають в катіонній



формі (Pb (II), Cd (II), Zn (II)). За обробки концентрованих металовмісних розчинів (з концентрацією йонів важких металів до 60 мг/дм<sup>3</sup>) іммобілізованими у складі біофлокул клітинами бактеріальної асоціації залишкова концентрація Pb (II), Cd (II), Zn (II) складає 0,03±0,001, 0,02±0,001 і 0,03±0,004 мг/дм<sup>3</sup> відповідно, що не перевищує гранично-допустимої їх концентрації для скидання очищених розчинів у каналізацію. Очищену від важких металів воду можна повторно використовувати у замкнутому технологічному процесі.

Розроблено екобезпечний і ефективний метод попереднього очищення води від фенолу та йонів важких металів асоціацією бактерій роду *Pseudomonas* – *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327 (1:1:1 в об'ємному співвідношенні) для подальшого її використання в комплексній біотехнології очищення стічних вод медичних закладів, виробництва фармацевтичних препаратів, гірничопромислових комплексів від поллютантів різної природи.

**Е. Г. Горшкова, Т. В. Гудзенко, О. В. Волювач,  
І. П. Конуп, Т. А. Беляєва**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина; тел.: +38 (068) 259 33 08,  
e-mail: tgudzenko@ukr.net

## **ОЧИСТКА ВОДЫ ОТ ФЕНОЛА И ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ АССОЦИАЦИЕЙ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS***

### **Реферат**

**Цель.** Очистка воды от фенола и ионов тяжелых металлов с использованием бактерий рода *Pseudomonas*. **Методы.** Эффективность микробной очистки оценена по степени извлечения из воды циклических ароматических соединений – фенола и тяжелых металлов [Pb (II), Cd (II), Zn (II)]. Концентрацию фенола определяли экстракционно-фотометрическим методом с использованием 4-аминоантипирин; тяжелых металлов - атомно-абсорбционным методом на пламенном атомно-абсорбционном спектрофотометре "Сатурн" в пламени смеси "воздух – пропан – бутан". **Результаты.** Для очистки воды от фенола и ионов тяжелых металлов использованы штаммы *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327. Установлено, что в присутствии отдельных штаммов микроорганизмов в количестве  $7,5 \times 10^5$  КОЕ / мл в течение 18–22 суток (в зависимости от выбранного штамма) происходит полное обесфеноливание водных растворов. При использовании ассоциации штаммов *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327 (1: 1: 1 в объемном соотношении) время глубокой очистки воды от фенола с исходной концентрацией в воде 300 мг/дм<sup>3</sup> сокращается до 10 суток. Степень извлечения Pb (II), Cd (II), Zn (II) из концентрированных растворов отдельными штаммами микроорганизмов в составе биофлокул достигает 95,00–99,95% при остаточном содержании ионов тяжелых металлов в растворе (0,03–1,0) мг/дм<sup>3</sup>. Использование ассоциации штаммов *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327 обеспечивает наибольшую эффективность очистки



воды от катионов тяжелых металлов. При обработке металл-содержащих растворов иммобилизованными в составе биофлокул клетками бактериальной ассоциации остаточная концентрация Pb (II), Cd (II), Zn (II) составляет  $0,03 \pm 0,001$ ,  $0,02 \pm 0,001$  и  $0,03 \pm 0,004$  мг / дм<sup>3</sup> соответственно, что не превышает предельно-допустимой их концентрации в очищенных водах для сброса в канализацию. **Вывод.** Использованные штаммы бактерий рода *Pseudomonas* характеризуются полифункциональным потенциалом биотехнологического назначения – деструктивным по отношению к фенолу и сорбционно-аккумулирующим относительно ионов тяжелых металлов, что раскрывает перспективы их использования в комплексной биотехнологии очистки окружающей среды от загрязнителей разной природы.

**Ключевые слова:** микробная очистка воды, фенол, ионы тяжелых металлов, ассоциация бактерий рода *Pseudomonas*.

**O. G. Gorshkova, T. V. Gudzenko, O. V. Voliuvach,  
I. P. Konup, T. O. Belyaeva**

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska St.,  
Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (068) 259 33 08,  
e-mail: tgudzenko@ukr.net

## PURIFICATION OF WATER FROM PHENOL AND IONS OF HEAVY METALS BY THE ASSOCIATION OF BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS*

### Summary

**Aim.** Purification of water from phenol and heavy metal ions using bacteria of the genus *Pseudomonas*. **Methods.** The effectiveness of microbial purification is estimated by the degree of extraction from the water of cyclic aromatic compounds - phenol and heavy metals [Pb (II), Cd (II), Zn (II)]. The phenol concentration was determined by the extraction-photometric method using 4-aminoantipyrine; heavy metals – by atomic absorption method on flame atomic absorption spectrophotometer "Saturn" in the flame of the air-propane-butane mixture. **Results.** The strains of *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327 were used for the first time to purify water from cyclic aromatic compounds (phenol) and heavy metal ions. It was found that in the presence of individual strains of microorganisms in the amount of  $7.5 \times 10^5$  CFU/ml for 18–22 days (depending on the chosen strain) complete dephenolization of aqueous solutions occurs. When using the association of strains *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327 (1: 1: 1 in volume ratio), the deep water purification from phenol with the initial concentration in water of 300 mg/dm<sup>3</sup> is reduced to 10 days. The degree of extraction of Pb (II), Cd (II), Zn (II) from concentrated solutions by individual strains of microorganisms in the composition of biofloques reaches 95,00–99,95% with residual content of heavy metal ions in solution (0,03–1,0) mg/dm<sup>3</sup>. Using the association of strains of *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327 provides the greatest efficiency of water purification from cations of heavy metals. In the treatment of metal-containing solutions immobilized in a biofloacular bacterial cell, the residual concentration of Pb (II), Cd (II), Zn (II) is  $0,03 \pm 0,001$ ,  $0,02 \pm$



0,001 and  $0,03 \pm 0,004$  mg/dm<sup>3</sup> accordingly, that does not exceed the maximum permissible concentration in purified waters for discharge into the sewage system. **Conclusion.** The used strains of bacteria of the genus *Pseudomonas* are characterized by polyfunctional potential of biotechnological purpose – destructive to phenol and sorption-accumulating relative to ions of heavy metals, which reveals the prospects of their use in complex biotechnology of environmental purification from the pollutants of different nature.

*Key words:* microbial purification of water, phenol, heavy metal ions, association of bacteria of the genus *Pseudomonas*.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бингам Ф. Т., Пръа Ф. Д., Джерелл У. М. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов / Под ред. Зигеля Х., Зигеля А.М. – М.: Мир, 1993. – 230 с.
2. Горб А. С. Гідрометеорологічні аспекти техногенного впливу на довкілля Дніпропетровської області : [монографія]/ А.С. Горб, Д.О. Довганенко, Л.В. Доценко, С.М. Сердюк, Л.І. Осадча, Н.П. Шерстюк. – Дніпропетровськ: Акцент ПП, 2014. – 230 с.
3. Давидова І. В. Екологічна оцінка забруднення водних об'єктів і ґрунтового покриву у процесі проведення вибухових робіт при розробці гранітних кар'єрів на Житомирському Поліссі : автореф. дис... канд. с.-г. наук; Житомир. нац. агрокол. ун-т. – Житомир, 2009. – 19 с.
4. Путилина Н. Т. Обесфеноливание сточных вод коксохимических заводов путем применения чистых, культур фенолразрушающих микробов // Гигиена и санитария. – 1952. – № 12. – с. 8-П.
5. Путилина Н. Т., Квитницкая Н. Н., Костовецкий Я. И. Микробный метод обесфеноливания сточных вод. – Киев: Здоровья, 1964. – 87 с.
6. Трахтенберг И. М., Колесников В. С., Луковенко В. П. Тяжелые металлы во внешней среде. Современные гигиенические и токсикологические аспекты. – Минск: Наука и техника, 1994. – 285 с.
7. Хенце М., Армос П., Ля-Кур-Янсен Й., Арван Э. Очистка сточных вод: Биологические и химические процессы / Под ред. С.В. Калюжного. – М.: Мир, 2004. – 480 с.
8. Шкіца Л. Є. Екологічна безпека гірничопромислових комплексів Західного регіону України : автореф. дис... д-ра техн. наук; Івано-Франк. нац. техн. ун-т нафти і газу. – Івано-Франківськ, 2006. – 36 с.
9. Шулаев М. В. Научные основы обезвреживания и жидких отходов гальванических и металлообрабатывающих производств с использованием анаэробной биосорбционной технологии : автореф. дис... д-ра. техн. наук; Казань, 2009. – 23 с.
10. <http://biology.krc.karelia.ru/misc/hydro/mon5.html>
11. Патент Российской Федерации на изобретение № 4234. МПК C02F3/34, C12 № 1/20, C12R1:01. Способ микробиологической очистки сточных вод промышленных предприятий от ионов тяжелых металлов: цинка, кадмия и свинца. - Опубл. 20.11.2003, Бюл. № 26.



12. Патент України на корисну модель №102265. МПК C02F 1/24 (2006.1), C02F 1/50 (2006.1), C02F/ 3/34 (2006.1). Спосіб очищення води від хрому (VI) з використанням мікроорганізмів / Іваниця В. О., Гудзенко Т. В., Волювач О. В., Горшкова О. Г., Беляєва Т. О., Конуп І. П. – Опубл.: 26.10.2015., Бюл. № 20.

13. Патент України на корисну модель №90550. Спосіб визначення нафтодеструктивної активності мікроорганізмів / Іваниця В. О., Гудзенко Т. В., Волювач О. В., Беляєва Т. О., Горшкова О. Г., Конуп І. П. – Опубл.: 26.05.14., Бюл. № 10, 2014.

### References

1. Bingam FT, Pra FD, Dzherell UM. Nekotoryye voprosy toksichnosti ionov metallov / Pod red. Zigelya Kh, Zigelya AM. M.: Mir. 1993: 230.

2. Gorb AS. Gidrometeorologichni aspekty` texnogenogo vply`vu na dovkillya Dnipropetrovs`koyi oblasti : [monografiya]/ AS. Gorb, DO. Dovganenko, L.V. Docenko, S.M. Serdyuk, L.I. Osadcha, N.P. Sherstyuk. Dnipropetrovs`k: Akcent PP, 2014 : 230.

3. Davy`dova IV. Ekologichna ocinka zabrudnennya vodny`x ob'yektiv i gruntovogo pokry`vu u procesi provedennya vy`buxovy`x robit pry` rozrobci granitny`x kar'yeriv na Zhy`tomy`rs`komu Polissi : avtoref. dy`s... kand. s.-g. nauk; Zhy`tomy`r. nacz. agroekol. un-t. Zhy`tomy`r, 2009 : 19

4. Putilina NT. Obesfenolivanie stochnyh vod koksohimicheskikh zavodov putem primenenija chistyh, kul'tur fenolrazrushajushhih mikrobov. Gigiena i sanitarija, 1952; 12: 8-P.

5. Putilina NT, Kvitnickaja HH., Kostoveckij JaI. Mikrobnyj metod obesfenolivaniya stochnyh vod. Kiev: Zdorov'ja, 1964: 87.

6. Trakhtenberg IM, Kolesnikov VS, Lukovenko VP. Tyazhelye metally vo vneshney srede. Sovremennyye gigiyenicheskiye i toksikologicheskiye aspekty. – Minsk: Nauka i tekhnika. 1994 : 285.

7. Khentse M, Armos P, Lya-Kur-Yansen Y, Arvan E. Ochistka stochnykh vod: Biologicheskkiye i khimicheskkiye protsessy / Pod red. S.V. Kalyuzhnogo. - M.: Mir. 2004 : 480.

8. Shkicza LYe. Ekologichna bezpeka girny`chopromy`slovy`x kompleksiv Zaxidnogo regionu Ukrayiny` : avtoref. dy`s...d-ra texn. nauk; Ivano-Frank. nacz. texn. un-t nafty` i gazu. – Ivano-Frankivs`k, 2006. 36.

9. Shulayev MV. Nauchnyye osnovy obezvrezhivaniya i zhidkikh otkhodov galvanicheskikh i metalloobrabatyvayushchikh proizvodstv s ispolzovaniem anaerobnoy biosorbtsionnoy tekhnologii : avtoref. dis... d-ra. tekhn. nauk; Kazan. 2009: 23.

10. <http://biology.krc.karelia.ru/misc/hydro/mon5.html>

11. Patent Rossijskoj Federacii na izobretenie № 4234. MPK S02F3/34, S12 № 1/20, S12R1:01. Sposob mikrobiologicheskoy ochistki stochnyh vod promyshlennyh predpriyatij ot ionov tyazhelyh metallov: cinka, kadmiya i svinca. - Opubl. 20.11.2003, Byul. № 26.



12. Patent Ukrainy` na kory`snu model` №102265. MPK C02F 1/24 (2006.1), S02F 1/50 (2006.1), C02F/ 3/34 (2006.1). Sposib ochy`shhennya vody` vid xromu (VI) z vy`kory`stannyam mikroorganizmiv / Ivany`cya V.O., Gudzenko T.V., Volyuvach O.V., Gorshkova O.G., Byelyayeva T.O., Konup I.P. – Opubl.: 26.10.2015., Byul. №20.

13. Patent Ukrainy` na kory`snu model` №90550. Sposib vy`znachennya naftodestrukty`vnoyi akty`vnosti mikroorganizmiv / Ivany`cya V.O., Gudzenko T.V., Volyuvach O.V., Byelyayeva T.O., Gorshkova O.G., Konup I.P. – Opubl.: 26.05.14., Byul. №10, 2014.

Стаття надійшла до редакції 07.06.2018 р.





О. А. Грицев<sup>1,2\*</sup>, О. Л. Зозуля<sup>2</sup>, Н. Г. Воробйова<sup>1</sup>,  
Л. М. Сківка<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», вул. Володимирська 60/13, Київ, 01601, Україна;

<sup>2</sup>ТОВ «Сингента», вул. Козацька 120/4, Київ, 03680, Україна,  
тел.: +38(097) 579 01 83 e-mail: olehhrytsev@gmail.com

## МОНІТОРИНГ ВИДОВОГО СКЛАДУ ГРИБІВ РОДУ *FUSARIUM* У НАСІННЄВОМУ МАТЕРІАЛІ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

**Мета роботи.** Дослідити видовий склад грибів роду *Fusarium* у насіннево-му матеріалі озимої пшениці по регіонах України. **Методи.** Зараженість насіння визначали під час пророщення у рулонах фільтрувального паперу. Молекулярну ідентифікацію видового складу грибів проводили за допомогою комерційних тест-систем. **Результати.** Проведений аналіз 109 зразків насінневого матеріалу озимої пшениці, зібраний з 78 районів, що входять до складу 21 області України. Практично у всіх зонах вирощування зернових культур на території України зерно пшениці уражене грибами роду *Fusarium*. Найбільша кількість уражених зразків пшениці виявлена на території західних та центральних областей. Переважальними видами у комплексі роду *Fusarium* були *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* та *F. avenaceum*. **Висновки.** Високий рівень інфікованості зерна пшениці збудника фузаріозів зумовлює необхідність щорічного моніторингу цього фітосанітарного показника на території України.

**Ключові слова:** фітопатогенні гриби, *Fusarium*, пшениця, фузаріози.

Одним із найважливіших напрямів розвитку сільського господарства в Україні є підвищення ефективності зернового комплексу. Зернові культури залишається ядром аграрного експорту держави. Головною зерновою культурою України є озима пшениця, на яку припадає майже 20% усіх посівних площ і 50% валового збору зернових у країні. Проте в останні роки спостерігається погіршення фітосанітарного стану посівів озимої пшениці. Причини цього явища є систематичне порушення вимог систем землеробства [5].

Відомо, що зернові культури можуть уражуватися понад 300–350 видами різноманітних організмів. Це комахи, гриби, бактерії, віруси, нематоди, гризуни, бур'яни тощо. Але основну загрозу для втрати врожаю, особливо на початкових фазах розвитку, в осінньо-зимовий період, становлять збудники грибкових інфекцій, серед яких одне з провідних місць посідають мікроміцети роду *Fusarium* [6, 7, 10]. Нестандартні погодні умови весняно-літніх періодів кількох останніх років обмежили, наприклад, поширення та накопичення фітофагів, але, водночас, сприяли посиленому розвитку грибних



хвороб. Інфікування зерна пшениці патогенними видами грибів цього роду знижує енергію його проростання та схожість, погіршує щільність клейковини та хлібопекарські властивості борошна. У зерні накопичуються мікотоксини – фузаріотоксини [8, 12]. Використання фузаріозного зерна пшениці у складі харчових або кормових продуктів може стати причиною розвитку аліментарних мікотоксикозів людини і тварин [6, 13, 15]. Найпоширенішими фузаріотоксинами є Т-2 токсин, дезоксиніваленон (ДОН або вомітоксин) та зеареленон (F-2 токсин), на котрі встановлені граничні норми вмісту в зерні та продуктах його переробки [3]. Мікотоксини практично не руйнуються у процесі переробки зернової сировини. Вони характеризуються мутагенною, тератогенною, канцерогенною, імуносупресивною та алергізувальною дією і складають серйозну загрозу здоров'ю і життю людини [2, 6].

Фузаріоз зерна за багатьма аспектами є унікальним захворюванням рослин, надзвичайно важким для вивчення. Одна з його відмітних особливостей – специфічна етіологія – участь у патологічному процесі комплексу різних видів грибів роду *Fusarium*. Вивчення складу етіологічних чинників фузаріозів є необхідною складовою для пошуку стійких сортів пшениці і планування фітосанітарних заходів, необхідних для вирішення проблеми зниження шкідливості цієї фітопатології.

Метою даної роботи було дослідити видовий склад грибів роду *Fusarium* у насінневному матеріалі озимої пшениці на території України.

### Матеріали і методи

Дослідження проводилися на базі лабораторії Білоцерківського діагностичного центру ТОВ «Сингента».

Об'єктами дослідження були 109 зразків насінневого матеріалу озимої пшениці, відібрані з 78 районів, що входять до складу 21 області України. Зараженість насіння визначали під час пророщення у рулонах фільтрувального паперу за температури 23 °С при сталій вологості повітря – 70% згідно ДСТУ 4138:2002 [4]. Для подальших досліджень та ідентифікації видового складу відбирали зразки з видимими симптомами фузаріозного ураження.

Усі роботи проводили в умовах ламінарного боксу 2-го класу захисту з дотриманням заходів асептики. Виділення тотальної ДНК з насінневого матеріалу проводили за допомогою комерційного набору для виділення ДНК з біологічного матеріалу (Агроген ново, Україна). Концентрацію ДНК, отриману з досліджуваних зразків, визначали на спектрофотометрі NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) та доводили стерильною дейонізованою водою до кінцевої концентрації 10 нг в 1мкл. Молекулярну ідентифікацію збудників фузаріозів проводили з використанням комплектів реагентів для проведення ПЛР-ампліфікації ДНК фітопатогенів згідно інструкції виробника (Агродіагностика, Росія). Детекцію ПЛР-продуктів здійснювали методом горизонтального електрофорезу в 2% агарозному гелі забарвленого бромистим етидієм з наступним відеогельдокументуванням на обладнанні Bio-Rad Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories Ltd., USA).



### Результати та їх обговорення

Кількісний та якісний склад різних видів фузарієвих грибів у біологічному матеріалі залежить від багатьох чинників, оскільки вони по-різному реагують на вологу та температуру навколишнього середовища. Види грибів роду *Fusarium* різняться за екологічними потребами, тому вони розподілені по різних природних нішах не випадковим чином – умови середовища впливають на видовий склад патогенів. Оскільки більшість видів фузарієвих грибів може існувати на широкому колі рослин, то представленість певного виду, у першу чергу, буде визначатися природно-кліматичними особливостями регіону, а його розповсюдженість залежить від щорічних метеорологічних флуктуацій. Досить часто з одного зразка зерна можна виділити представників 10–15 різних видів грибів роду *Fusarium*. Навіть з однієї зернівки можуть виділятися декілька видів грибів. Проте в певній місцевості характерним є переважальними лише 1–4 видів [1].

За результатами проведеного дослідження на насінневому матеріалі озимої пшениці було виявлено та ідентифіковано сім видів грибів роду *Fusarium*: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*. Серед них, переважальним видом у більшості регіонів України був *F. graminearum* (табл.).

Частота виявлення цього збудника серед 109 досліджуваних зразків становила 71%. Цей вид є особливо небезпечним через його здатність продукувати мікотоксин ДОН. Згідно даних літератури *F. graminearum* переважає серед збудників фузаріозів зернових культур у Північній Америці та Південній Європі [11]. За нашими даними цей збудник зустрічався у великій кількості в різних географічних регіонах України: Донецькій, Запорізькій, Кіровоградській, Сумській, Херсонській, Черкаській та Чернігівській областях. Відсутність залежності поширення цього збудника фузаріозів від географічного положення досліджуваного регіону свідчить про те, що кліматичні особливості є не єдиним чинником, котрий визначає частоту його виявлення. Додатковими чинниками слід вважати довготривале систематичне порушення вимог систем землеробства [6], а також переважання тих чи інших сортів зернових культур, у тому числі й пшениці, котрі характеризуються різною чутливістю до збудників фузаріозів [9].

Також слід зауважити на високу частоту виявлення *F. sporotrichioides* та *F. avenaceum*, яка становила 18,5% та 13,9% відповідно. Гриб *F. sporotrichioides* утворює високотоксичний Т2-токсин. Частка цього виду в комплексі роду переважала у Дніпропетровській, Запорізькій та Луганській областях.

Загалом, ці три види фузарієвих грибів в складі роду становили 71,7% серед усіх ідентифікованих (рис.). Слід зазначити, що згідно з ДСТУ 3768:2010 уражених фузаріозом зерен не повинно бути більше, ніж 0,3–0,5% залежно від класу зерна.

Наступним за частотою виявлення був *F. poae*, який ідентифікували у 28% досліджуваних зразків. *F. poae* є надзвичайно небезпечним збудником, оскільки є одним із головних продуцентів трихотеценів, великої групи се-

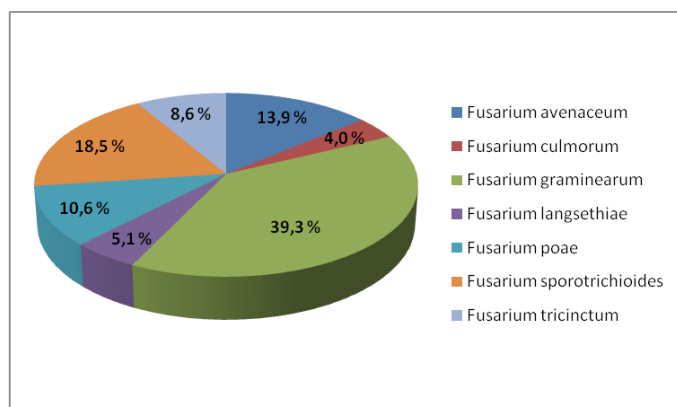
сквітерпенових епоксидів – мікотоксинів, котрі пригнічують синтез білка в еукаріотній клітині і, у такий спосіб, спричиняють розвиток анемії та імуно-супресію [14].

Таблиця  
Представленість ідентифікованих видів *Fusarium* (%) у насіннєвому матеріалі озимої пшениці по областях України

Table  
Representation of the identified species of *Fusarium* (%) in winter wheat seed by the regions of Ukraine

Області	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium cerealis</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium langsethiae</i>	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	<i>Fusarium tritinctum</i>
Волинська	17,6	0	0	17,6	17,6	12,0	17,6	17,6
Дніпропетровська	14,3	0	14,3	14,3	14,3	0	28,5	14,3
Донецька	0	0	0	77,8	0	0	11,1	11,1
Житомирська	18,2	0	9,0	36,5	0	27,3	0	9,0
Запорізька	0	0	0	50,0	0	0	50,0	0
Івано-Франківська	16,6	0	8,5	16,6	8,5	16,6	16,6	16,6
Київська	33,4	0	0	46,6	0	6,7	13,3	0
Кіровоградська	11,1	0	0	55,5	0	22,3	11,1	0
Луганська	7,7	0	0	7,7	0	30,7	38,5	15,4
Львівська	16,8	0	0	16,6	16,6	16,8	16,6	16,6
Миколаївська	30,7	0	0	46,1	0	7,8	15,4	0
Одеська	13,1	0	0	26,0	4,4	17,4	21,7	17,4
Полтавська	0	0	10,0	30,0	0	20,0	30,0	10,0
Рівненська	10,0	0	0	20,0	20,0	20,0	10,0	20,0
Сумська	33,4	0	0	66,6	0	0	0	0
Тернопільська	5,0	0	5,0	20,0	10,0	20,0	20,0	20,0
Харківська	25,0	0	0	41,6	0	16,7	16,7	0
Херсонська	0	0	15,4	61,5	0	0	23,1	0
Хмельницька	10,0	0	10,0	10,0	20,0	10,0	20,0	20,0
Черкаська	0	0	0	100,0	0	0	0	0
Чернігівська	20,0	0	0	60,0	0	0	20,0	0





**Рис. Видовий склад грибів роду *Fusarium* (%), виявлених на насінні озимої пшениці в Україні**

**Fig. Species composition of fungi of the genus *Fusarium* (%) found on winter wheat seeds in Ukraine**

Слід відзначити досить високий відсоток у видовому складі ідентифікованих фузарій *F. tricinatum* (8,6%), котрий продукує мікотоксин моніліформін, вміст якого не регламентується, проте він являє небезпеку для здоров'я ссавців та птахів через цитотоксичну та кардіоміопатичну дію. Варто зазначити, що на організм тварин мікотоксини найчастіше справляють синергічний і адитивний вплив. Так, один з мікотоксинів полегшує іншому шлях проникнення у клітину тваринного організму, тоді дія останнього підвищується. Адитивний тип взаємовпливу серед мікотоксинів властивий для ДОН і охратоксину А, ДОН і афлотоксину, Т-2 токсину і фумонізину В, у результаті чого відбувається підсилення токсичної дії одного мікотоксину за наявності іншого.

Крім вищевказаних видів виявляли *F. langsethiae* та *F. culmorum*. Частота виявлення цих двох видів серед всіх зразків 5% та 4% відповідно. Моніторинг представленості *F. langsethiae* в європейських країнах є пріоритетним, оскільки в останні роки підвищилось забруднення зерна Т-2 токсином пов'язаним з розповсюдженням цього виду [8]. *F. culmorum*, який є джерелом снігової плісняви та може бути причиною корневих гнилей і фузаріозу колоса, поодиноким виявляється переважно у західних областях України.

Що стосується географії розповсюдження фузаріозних грибів на території України, то в наших дослідженнях були відзначені суттєві відмінності за загальним відсотком інфікованості зразків та співвідношенням ідентифікованих видів на насінневому матеріалі озимої пшениці у різних регіонах країни. Зокрема в західних та центральних областях простежується значно вищий інфекційний фон, ніж в інших регіонах України. Це пов'язано з тим, що гриби, як і всі інші організми, реагують на зміну чинників навколишнього середовища. Широке розповсюдження одних видів грибів і вузьколокальне — інших, регулярні епіфітотії в одних регіонах і незначний розвиток хвороби в інших, у першу чергу, пов'язаний з умовами середовища. Отримані дані під-

тверджують, що збудникам фузаріозних хвороб притаманні пристосувальні реакції, які дозволяють їм існувати в мінливих ґрунтово-кліматичних умовах.

Результати проведеного аналізу показують наявність у всіх зонах вирощування зернових культур на території України значний запас інфекції фузарієвих грибів, в тому числі продуцентів небезпечних мікотоксинів. Будь-які сприятливі для цих грибів зміни можуть спричинити значне погіршення посівних та харчових якостей зерна, знизити урожайність та сприяють до накопичення мікотоксинів у зерні, що може мати негативні наслідки для здоров'я людини та тварин і зумовлює необхідність щорічного моніторингу ураження зерна мікроміцетами з роду *Fusarium* на території України.

О. А. Грищев<sup>1,2</sup>, О. Л. Зозуля<sup>2</sup>, Н. Г. Воробьева<sup>1</sup>,  
Л. М. Сківка<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, УНЦ «Институт биологии и медицины», ул. Владимирская 60/13, Киев, 01601, Украина, e-mail: olehhrytsev@gmail.com;

<sup>2</sup>ООО «Сингента», ул. Казацкая 120/4, Киев, 03680, Украина

## МОНІТОРИНГ ВИДОВОГО СОСТАВА ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* В СЕМЕННОМ МАТЕРИАЛЕ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ

### Реферат

**Цель.** Исследовать видовой состав грибов рода *Fusarium* в семенном материале озимой пшеницы по регионам Украины. **Методы.** Инфицированность зерен определяли во время проращивания в рулонах фильтровальной бумаги. Молекулярную идентификацию видового состава проводили с помощью коммерческих тест-систем. **Результаты.** Проведен анализ 109 образцов семенного материала озимой пшеницы, собранного в 78 районах, входящих в состав 21 области Украины. Практически во всех регионах выращивания зерновых культур на территории Украины зерно поражено грибами рода *Fusarium*. Наибольшее количество пораженных образцов пшеницы выявлено на территории западных и центральных областей. Преобладающими видами в комплексе рода *Fusarium* были *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* та *F. avenaceum*. **Выводы.** Высокий уровень инфицированности зерна пшеницы возбудителями фузариозов обуславливает необходимость ежегодного мониторинга этого фитосанитарного показателя на территории Украины.

**Ключевые слова:** фитопатогенные грибы, *Fusarium*, пшеница, фузариозы.



**O. A. Hrytsev<sup>1,2</sup>, A. L. Zozulya<sup>2</sup>, N. G. Vorobieva<sup>1</sup>, L. M. Skivka<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC "Institute of Biology and Medicine",  
60/13, Volodymyrska str., Kyiv, Ukraine, 01601,  
e-mail: olehhrytsev@gmail.com;

<sup>2</sup>LLC «Syngenta», 120/4, Kozatska str., Kyiv, Ukraine, 03680

## MONITORING OF SPECIES COMPOSITION OF FUNGI OF THE GENUS *FUSARIUM* IN SEED MATERIALS OF WINTER WHEAT ON UKRAINIAN TERRITORY

### Summary

**Aim.** To investigate strain composition of fungi of the genus *Fusarium* in winter wheat grain in Ukraine. **Methods.** Contamination of wheat grains with fungi was detected during their sprouting in rolls of filter paper. Molecular diagnostics of strain composition was performed with the use of commercial test-systems. **Results.** The analysis of 109 seed samples of winter wheat from 21 regions of Ukraine was conducted. Virtually in all regions of the cultivation of grain crops in Ukraine, grains are affected by fungi of the genus *Fusarium*. The greatest number of affected samples of wheat was revealed on the territory of western and central regions. The prevail species in the complex of the genus *Fusarium* were *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. avenaceum*. **Conclusions.** The high level of the wheat grain infection with causative agents of fusariosis necessitates annual monitoring of this phytosanitary index on the territory of Ukraine.

*Key words:* phytopathogenic fungi, *Fusarium*, wheat, fusariosis.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гагкаева Т. Ю., Гаврилова О. П., Левитин М. М., Новожилов К. В. Фузариоз зерновых культур // Приложения к журналу «Защита и карантин растений». – 2011. – 5. – 120 с.
2. Гагкаева Т. Ю., Ганнибал Ф. Б., Гаврилова О. П. Зараженность зерна пшеницы грибами *Fusarium* и *Alternaria* на юге России в 2010 году // Защита и карантин растений. – 2012. – № 5. – С. 37–41.
3. ДСТУ 3768:2010. Пшениця. Технічні умови. – К.: Держспоживстандарт України, 2010. – 17 с.
4. ДСТУ 4138:2002. Насіння сільськогосподарських культур. – К.: Держспоживстандарт України, 2003. – 170 с.
5. Моргун В. В., Топчий Т. В. Пошук нових джерел стійкості пшениці озимої до основних збудників грибних хвороб // Физиология растений и генетика. – 2016. – т. 48, № 5. – С. 393–400.
6. Тимощук Т. М., Трембіцький В. А., Бачинська Н. М., Дереча І. М. Моніторинг поширення токсинуотворюючих мікроміцетів зерна пшениці озимої в умовах Полісся // Агроєкологія. – 2014. – 2(42). – С. 87–93.
7. Швартау В. В., Зозуля О. Л., Михальська Л. М., Санін О. Ю. Фузаріози культурних рослин. – К.: Логос, 2016. – 164 с.
8. Beli D., Laze A., Stafasani M., Varaku S., Ceca E. Influence of Fusariosis in the biochemical and rheological properties of different wheat cultivars // JMEST. – 2017. – V. 4(9). – P. 8250–8255.



9. Cuperlovic-Culf M., Wang L., Forseille L., Boyle K., Merkley N., Burton I., Fobert P.R. Metabolic biomarker panels of response to fusarium head blight infection in different wheat varieties // *PloS One*. – 2016. – 11(4) : e0153642. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153642>.

10. Figueroa M., Hammond-Kosack K. E., Solomon P. S. A review of wheat diseases – a field perspective // *Mol Plant Patol*. – 2017. – DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12618>.

11. Grabowski A., Siuda R., Lenc L., Jaroszek-Scisel J. Effects of the degree of fusariosis on the physical characteristics of individual wheat kernels // *International Journal of Food Science and Technology*. – 2012. – DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02949.x>.

12. Hudec K., Muchova D. Influence of Temperature and Species Origin on *Fusarium spp.* And *Microdochium nivale* Pathogenicity to Wheat Seedlings // *Plant Protect. Sci.* – 2010. Vol. 46, No. 2. – P. 59–65.

13. Nesic K., Ivanovic S., Nesic V. Fusarial toxins: secondary metabolites of *Fusarium* fungi // *Rev Environ Contam Toxicol*. – 2014. – 228. – P. 101–20. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-01619-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-01619-1_5).

14. Stanciu O., Banc R., Cozma A., Filip L., Miere D., Manes J., Loghin F. Occurrence of *Fusarium* Mycotoxins in Wheat From Europe – a Review // *Acta Universitatis Cibiniensis Series E :FOOD TECHNOLOGY*. – 2015. – Vol. XIX, no. 1. – P. 35-60. DOI: <https://doi.org/10.1515/auaft-2015-0005>.

15. van der Lee T., Zhang H., van Diepeningen A., Waalwijk C. Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes : a review // *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2015; 32(4): 453 – 60. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.984244>.

## References

1. Gagkaeva Tyu, Gavrilova OP, Levitin MM, Novozhilov KV. Fusarium head blight. *Prilozheniya k zhurnalu «Zaschita i karantin rasteniy»*. 2011;(5):120. (in Russian)

2. Gagkaeva Tyu, Gannibal FB, Gavrilova OP. Infection of wheat grain with fungi *Fusarium* and *Alternaria* in outhern Russia in 2010. *Zaschita i karantin rasteniy*. 2012;(5):37-41. (in Russian)

3. DSTU 3768:2010. Wheat. Specifications. Kyiv: Derzhspozhyvstandart Ukrainy. 2010:17. (in Ukrainian)

4. DSTU 4138:2002. Seeds of agricultural crops. Kyiv: Derzhspozhyvstandart Ukrainy. 2003:170. (in Ukrainian)

5. Morgun VV, Topchiiy TV. Search for new sources of resistance of winter wheat to the main causal agents of fungal diseases. *Fiziologiya rasteniy i genetika*. 2016;48(5):393–400. (in Ukrainian)

6. Tymoschuk TM, Trembitsky VA, Bachinsk NM, Derech IM. Monitoring of the distribution of toxic micromycetes of wheat grains of winter wheat in the Polissya. *Ahroekolohiia*. 2014;2(42):87-93. (in Ukrainian)

7. Shvartau VV, Zozulya OL, Mykhalska LM, Sanin Oyu. Fusariosis of cultivated plants. Kyiv: Logos, 2016. 164 p. (in Ukrainian)





8. Beli D, Laze A, Stafasani M, Varaku S, Ceca E. Influence of Fusariosis in the biochemical and rheological properties of different wheat cultivars. JMEST. 2017;4(9):8250-8255.

9. Cuperlovic-Culf M, Wang L, Forseille L, Boyle K, Merkley N, Burton I, Fobert PR. Metabolic biomarker panels of response to fusarium head blight infection in different wheat varieties. PloS One. 2016;11(4): e0153642. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153642>.

10. Figueroa M, Hammond-Kosack KE, Solomon PS. A review of wheat diseases – a field perspective. Mol Plant Patol. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12618>.

11. Grabowski A, Siuda R, Lenc L, Jaroszek-S`cisel J. Effects of the degree of fusariosis on the physical characteristics of individual wheal kernels. International Journal of Food Science and Technology. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02949.x>.

12. Hudec K, Muchova D. influence of temperature and species origin on Fusarium spp. And Microdochium nivale pathogenicity to wheat seedlings. Plant Protect. Sci. 2010;46(2):59-65.

13. Nestic K, Ivanovic S, Nestic V. Fusarial toxins: secondary metabolites of Fusarium fungi. Rev Environ Contam Toxicol. 2014;228:101-20. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-01619-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-01619-1_5).

14. Stanciu O, Banc R, Cozma A, Filip L, Miere D, Manes J, Loghin F. Occurrence of Fusarium mycotoxins in wheat from Europe – a Review. Acta Universitatis Cibiniensis Series E :FOOD TECHNOLOGY. 2015;19(1):35-60. DOI: <https://doi.org/10.1515/aucft-2015-0005>.

15. van der Lee T, Zhang H, van Diepeningen A, Waalwijk C. Biogeography of Fuarium graminearum species complex and chemotypes : a rewiew. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2015; 32(4):453 – 60. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.984244>.

Стаття надійшла до редакції 06.06.2018 р.



## 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 шрифтом 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 абрєвіатури 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.* – 9<sup>th</sup> 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 phthalate esters by micrococci // Arch. Microbiol. – 1982. – 132, № 2. – P. 185 – 188.

#### **На тези доповідей**

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

#### **На депоновані наукові роботи**

1. Лопатина Н. В., Терентьев А. Н., Наталіч 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 GdYVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> 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/](http://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 25.06.2018 р. Формат 70x100/16.  
Ум.-друк. арк. 7,72. Тираж 100 пр.  
Зам. № 1775

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