

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
Microbiology & Biotechnology

№ 3(4)
2008

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 3(4)

•
2008

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsya

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka

EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

Scientific editor V.O. Ivanytsya, T.O. Filipova

Accepted for publishing articles are reviewed

The journal is established by

Odesa National Mechnykov University.

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

PUBLISHER

Odesa National Mechnykov University

Approved for publishing by Academic Council of

Odesa National Mechnykov University

Publishing editor N.G. Yurgelaitis

Editors: I.M. Omelchenko, L.B. Kotlyarova

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University

Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine

Tel. 7317151, 7466391

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

www.mbt.onu.edu.ua

© Odesa National Mechnykov University, 2008

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ
№ 3(4)

•
2008

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР
В.О. Іваниця

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА
Т.О. Філіпова

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР
Т.В. Бурлака

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

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

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

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються
Журнал заснований

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

ВИДАВЕЦЬ

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

Затверджено до друку Вченою радою
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

Завідувач редакцією Н.Г. Юргелайтіс
Редактори: І.М. Омельченко, Л.Б. Котлярова

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

© Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, 2008

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

L. D. Varbanets, N. V. Borzova XYLANASES OF MICROORGANISMS.....	8
---	---

E.V. Kuzminskiy, P.I. Gvozdyak, N.B. Golub BIOFUEL CELLS — THE PROBLEMS AND PERSPECTIVES OF DEVELOPMENT. I. ENZYME FUEL CELLS	21
--	----

EXPERIMENTAL WORKS

L. A. Zhukouskaya, R. V. Mikhailova, T. V. Semashko, A. G. Lobanok, D. G. Yarmolinsky, N. A. Kartel KLONING OF GLUCOSE OXIDASE GENE IN <i>PENICILLIUM ADAMETZII</i> LF F-2044.1	31
--	----

I. O. Malarchik, T. O. Filipova, B. M. Galkin, L. M. Vostrova, M. V. Grenaderova ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF N-BENZOTIAZOL-2-YL-BENZEN- SULFONAMIDE AND THEIR ANALOGS WITH NUCLEOPHYLIC RADICALS ..	40
--	----

A. A. Halushka, T. B. Peretyatko, S. P. Gudz INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE ON <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	49
--	----

N. M. Zhdanova, S. V. Olishevskaya, A. I. Vasylevska, I. M. Kurchenko, V. L. Ayzenberg, V. L. Artysheva, L. T. Nakonechna, G. P. Kapichon SCREENING OF MICROMYCETES STRAINS GROWN AND DISRUPTED THE CELLULOSE SUBSTRATE.....	58
---	----

N. V. Limanska, A. M. Venger, Ye Shuai, V. O. Ivanytsya THE STUDY OF ATTACHMENT PROPERTIES OF GRAPE CROWN GALL AGENTS STRAINS.....	64
---	----

V. V. Pozur, L. M. Skivka, G. P. Potebnya THE REACTION OF MICE LYMPHOID ORGANS ON PEPTIDOGLYCAN OF <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> WOOD 46 IN NORM AND UNDER TUMOR GROWTH	69
--	----

L. Yu. Lukachinets, S. Yu. Chundak, N. V. Boyko ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE COMPLEX COMPOUNDS OF NITRATE CADMIUM (II) WITH THE 3-, 4- NITROBENZOHYDRAZIDES	75
---	----

N. S. Vodzinska, T. O. Filipova, B. M. Galkin, Yu. V. Ishkov, G. M. Kirichenko STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGE INACTIVATION IN THE PRESENCE OF SYNTHETIC PORPHYRINS.....	82
--	----

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

Л. Д. Варбанець, Н. В. Борзова
КСИЛАНАЗИ МІКРООРГАНІЗМІВ 8

Є. В. Кузьмінський, П.І. Гвоздяк, Н. Б. Голуб
БІОПАЛИВНІ ЕЛЕМЕНТИ — ПРОБЛЕМИ І ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ І.
ФЕРМЕНТНІ ПАЛИВНІ ЕЛЕМЕНТИ 21

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

**Л.А. Жуковская, Р.В. Михайлова, Т.В. Семашко, А.Г. Лобанок,
Д.Г. Ярмолинский, Н.А. Картель**
КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ В *PENICILLIUM*
ADAMETZII ЛФ F-2044.1 31

**І.О. Малярчик, Т.О. Філіпова, Б.М. Галкін, Л.М. Вострова,
М.В. Гренадьорова**
АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ N-БЕНЗОТІАЗОЛ-2-ІЛ-БЕНЗЕН-
СУЛЬФОНАМІДУ І ЙОГО АНАЛОГІВ З НУКЛЕОФІЛЬНИМИ
ЗАМІСНИКАМИ 40

А.А. Галушка, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь
ВПЛИВ СІРКОВОДНЮ НА *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* 49

**Н.М. Жданова, С.В. Олішевська, А.І. Василевська, В.Л. Айзенберг,
І.М. Курченко, Л.В. Артишкова, Л.Т. Наконечна, Г.П. Капічон**
СКРИНІНГ ШТАМІВ МІКРОМІЦЕТІВ, ЩО ЗДАТНІ РОСТИ ТА РУЙНУВАТИ
ЦЕЛЮЛОЗОВМІСНИЙ СУБСТРАТ 58

Н. В. Ліманська, А. М. Венгер, Є Шуай, В. О. Іваниця 64
ВИВЧЕННЯ АДГЕЗИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМІВ ЗБУДНИКІВ
БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ ВІНОГРАДУ 64

В. В. Позур, Л. М. Сківка, Г. П. Потебня
РЕАКЦІЯ ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНІВ МИШЕЙ НА ПЕПТИДОГЛІКАН *STAPHY-*
LOCOCCUS AUREUS WOOD 46 В НОРМІ І ПРИ ПУХЛИННОМУ РОСТІ..... 69

Л. Ю. Лукачинець, С. Ю. Чундак, Н. В. Бойко
АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСНИХ СПОЛУК НІТРАТУ
КАДМІЮ (II) З 3-,4-НІТРОБЕНЗГІДРАЗИДАМИ 75

Н. С. Водзінська, Т. О. Філіпова, Б. М. Галкін, Ю. В. Ішков, Г. М. Кириченко
ІНАКТИВАЦІЯ СТАФИЛОКОКОВОГО БАКТЕРІОФАГА В ПРИСУТНОСТІ
СИНТЕТИЧНИХ ПОРФІРИНІВ 82

U. Ya. Stambulska, V. I. Lushchak BACTERIA <i>RHIZOBIUM</i> EFFECT ON PIGMENTS AND STARCH CONTENT IN PEA PLANTS.....	89
---	----

N. R. Demchenko, S. V. Prichodko, I. N. Kurmakova, A. P. Tretyak SUCCESSION OF CORROSION MICROBIAL ASSOCIATION AT BIOFILM FORMING ON THE STEEL SURFACE IN THE PRESENCE OF ORGANIC COMPOUNDS	95
---	----

CHRONICALE OF SCIENTIFIC LIFE

O. Mameeva 12 TH INTERNATIONAL CONGRESS ON YEASTS Kyiv, 11-15 August 2008.....	101
--	-----

INFORMATION FOR THE AUTHORS.....	110
----------------------------------	-----

У. Я. Стамбульська, В.І. Лушак
ВПЛИВ БАКТЕРІЙ РОДУ *RHIZOBIUM* НА КОНЦЕНТРАЦІЮ ПІГМЕНТІВ І
КРОХМАЛЮ У РОСЛИН ГОРОХУ 89

Н. Р. Демченко, С. В. Приходько, І. М. Курмакова, О. П. Третяк
СУКЦЕСІЯ КОРОЗІЙНОГО МІКРОБНОГО УГРУПОВАННЯ ПРИ
ФОРМУВАННІ БІОПЛІВКИ НА СТАЛЕВІЙ ПОВЕРХНІ ЗА ПРИСУТНОСТІ
ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК 95

ХРОНІКА НАУКОВОГО ЖИТТЯ

О. Мамеєва
МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ.12-Й МІЖНАРОДНИЙ ДРІЖДЖОВИЙ
КОНГРЕС, Київ, 11-15 серпня 2008..... 101

АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ
У 2007—2008 РОКАХ У ЖУРНАЛІ“МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ”.. 104

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ 110

УДК 577.151.62

Л. Д. Варбанець, Н. В. Борзова

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП Д03680, Україна, тел.: 8 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

КСИЛАНАЗИ МІКРООРГАНІЗМІВ

У статті наведені дані щодо ксиланаз – ферментів, які беруть участь в розщепленні природних полісахаридів, зокрема ксиланів. Показано, що в залежності від походження, структура і хімічний склад ксиланів в значній мірі варіюють, що обумовлює участь в їх розщепленні, крім ксиланаз, і інших ферментів, таких як арабінофуранозідази, β-глюкуронідази, естерази. Показано, що здатність продукувати ферменти, які деградують ксилан, притаманна грибам, актиноміцетам і еубактеріям. Ксиланози різного походження відрізняються фізико-хімічними властивостями, субстратною специфічністю. Показана можливість застосування ксиланаз у целюлозо-паперовій і харчовій промисловості, у виробництві хліба, напоїв, текстилю.

Ключові слова: ксиланози, мікроорганізми, субстратна специфічність, фізико-хімічні властивості, практичне застосування.

Наявність великих ресурсів целюлози і геміцелюлози в рослинній біомасі робить все більш актуальною проблему залучення рослинних відходів сільського господарства і промисловості в процеси мікробної конверсії для отримання харчового і кормового білка і фізіологічно активних речовин. Від 20 до 40 % від сухої ваги сільськогосподарських відходів складає ксилан, який разом з геміцелюлозою утворює другий найбільш широко розповсюджений в біосфері полісахарид, здатний до відновлення. Було оцінено, що 500 млн тон таких матеріалів можуть бути щорічно доступні тільки від залишків головних зернових культур. Тому розвиток малокоштовних технологій, які ґрунтуються на геміцелюлозі, викликає інтерес у дослідників. Ймовірно, в недалекому майбутньому, ксилан в комбінації з целюлозою забезпечить більшість світових потреб в сировині. Можливо передбачити, що в наступні 50 років вугілля та неочищена нафта будуть замінені біомасою. В багатьох технологічних процесах, перш за все при виробництві паперу та целюлози, ксилан є небажаним домішкою, і повстає проблема його деградації. Необхідно гідролізувати ксилан також в деяких процесах харчової і кормової промисловості, при комплексній переробці рослинних відходів. Гідроліз ксилану може бути здійснений за допомогою хімічних реагентів або ферментативним шляхом. Ферментативний гідроліз є переважливим, оскільки менш впливає на структуру інших волокон і утворюється менше хімічних відходів. В харчовій або кормовій промисловостях хімічний гідроліз взагалі неприйнятний.

© Л. Д. Варбанець, Н. В. Борзова, 2008



Для мікробного гідролізу ксилану необхідна дія таких ферментів, як β -1,4-ксилазази і β -ксилозидази. Ендо-1,4- β -D-ксилаза або 1,4- β -D-ксилаза ксиланогідролаза (КФ 3.2.1.8) — фермент, який здійснює неупорядкований гідроліз внутрішньомолекулярних ксилозидних зв'язків ксиланів або ксилоолігосахаридів. Високомолекулярні ксилани мають перевагу для дії ферменту в порівнянні з олігомерними ланцюгами, швидкість гідролізу яких знижується зі зменшенням ступеня полімерізації. Другий фермент, який бере участь в розщепленні ксиланів, — екзо-1,4- β -D-ксилозидаза (КФ 3.2.1.37) або β -ксилозидаза, яка каталізує гідроліз олігосахаридів шляхом послідовного відщеплення залишків D-ксилози з нередукуючого кінця. Встановлено, що активність ксилозидази найбільша по відношенню до ксилобіози і зменшується зі збільшенням довжини ланцюга субстрата.

Джерелами ксиланаз можуть бути безхребетні тварини, вищі рослини, насіння, морські водорості, але найбільш технологічними є мікроорганізми — гриби, бактерії, дріжджі [1]. Мікробні ксиланози завдяки їх високій специфічності, м'яким умовам реакції, незначним витратам субстрата і утворенню побічних продуктів, є найбільш перспективними каталізаторами для гідролізу ксилану. Але вартість ферментативного гідролізу біомаси є одним з факторів, який лімітує економічну доцільність процесу. Продукція ксиланаз тим не менш може бути покращена знаходженням більш потужних штамів грибів або бактерій, або одержанням мутантних штамів, здатних продукувати значну кількість ферментів, або і те, і інше. Більшість бактерій і грибів продукують позаклітинні ксиланози, які діють на геміцелюлозний матеріал зі звільненням ксилози, як кінцевого продукту, що здатний безпосередньо асимілюватися, тим самим дозволяючи організму рости гетеротрофно на ксилані. Мікроорганізми рубця жуйних тварин, як відомо, є потенційними продуцентами ксиланаз, можливо завдяки високому вмісту геміцелюлозу в харчуванні жуйних тварин.

В сучасній промисловості використовуються ксиланози бактеріального та грибового походження. Більшість грибних ксиланаз належить до 10-ої і 11-ої родини глікозил-гідролаз, які відрізняються за фізичними властивостями, субстратною специфічністю і оптимумом рН. Деякі гриби містять гени, які кодують декілька різних ксиланаз, які належать як до одного, так і до різних родин, і синтезують декілька ксиланаз одночасно. На сьогодні ідентифіковано принаймні 89 різних родин глікозил гідролаз. Ксиланози відносяться до 10 і 11 родин. Ферменти родини 10 мають упаковку $(\alpha/\beta)_8$ бочечок, в той час як члени родини 11 характеризуються β -гелевою упаковкою. Психрофільні ксиланози, на основі первинної структури можуть бути віднесені до родини 8, проявляючи на 20–30 % подібну послідовність з її членами. Родина 8 головним чином включає ендоглюканази (ЕС 3.2.1.4), а також хітозанази (ЕС 3.2.1.132) і ліхенази (ЕС 3.2.1.73).

Структура ксилану

В залежності від походження, структура і хімічний склад ксилана в значній мірі варіює, але в будь-якому випадку, коровий ланцюг утворений β -1,4-зв'язаними залишками D-ксилози. Він може бути або незаміщений, як в ксиланах оболонки насіння гуару, альфа еспарти, стебел тютюну, у вигляді гомополімерів або арабіноксиланів, глюкуроноксиланів і глюкуроноарабіноксиланів. Але в кожній категорії існує мікрогетерогенність, обумовлена ступенем та природою розгалуження. Так, гомополімерний коровий ланцюг з 1,4-зв'язаних β -D-ксилопіранозних залишків може бути заміщений при C-2 і C-3 положеннях



О-ацетильними групами, залишками α -L-арабінофуранози, α -1,2-зв'язаною глюкуроною або 4-О-метилглюкуроною кислотами [10]. Ксилани дерев містять як О-ацетил-4-О-метилглюкуроноксилани в твердій деревині, так і арабіно-4-О-метил глюкуроноксилани в м'якій деревині. Ступінь полімеризації ксиланів в твердій деревині (150-200) вище, ніж в м'якій (70-130). Ксилани злакових містять D-глюкуронову кислоту і/або її 4-О-метильний ефір та арабінозу. Арабіноксилани ендосперму річних рослин, пентозани, більш розчинні у воді і лугах, ніж ксилани лігноцелюлоз внаслідок їх розгалуженої структури [18].

Внаслідок такої гетерогенності ксилану, для повної деградації полісахаридів необхідний складний спектр ферментів. Головний компонент комплексу утворений ендо- β -1,4-ксиланазами, тобто так званими ксиланазами, які гідролізують корову частину до немодифікованих залишків. Для розщеплення бокових ланцюгів, крім ксиланаз, потрібний достатньо широкий спектр ферментів, таких як арабінофуранозидази, β -глюкуронідази, естерази, але для більшості технологічних процесів достатньо дії ферменту, який розщеплює головний ланцюг ксилану — ендо- β -1,4-ксиланази. О-ацетильні групи, присутні при С-2 і С-3 положеннях залишків ксилози, заважають ксиланазам повністю деградувати ацетилксилан, ймовірно за рахунок стеричної перешкоди. Синергічна дія ацетилксилан естераз і ксиланаз є суттєвою для повного гідролізу ацетилксиланів. На структурі деяких ксиланів було показано присутність незначної кількості феруоїль- і *n*-курамоїльних кислот, які приєднані через залишки L-арабінози. Ці кислоти приєднані до С5 залишка арабінози. В багатьох випадках була показана присутність ковалентного зв'язку між лігніном і геміцелюлозою через замісники ксилану. Було доведено наявність етерних зв'язків між арабінозою і лігніном [53] і глюкуроною кислотою і лігніном [12]. Феруоїльні групи також можуть перехресно зв'язувати ксилан і лігнін [48]. Бокові ланцюги визначають розчинність, фізичну конформацію і реактивність молекули ксилану з іншими целюлолітичними компонентами, і тому значною мірою впливають на спосіб і ступінь ферментативного розщеплення.

Була описана трьохвимірна структура молекул ксилана [6] і показано, що в кристалічних умовах кор ксилану має лівозавернуту потрійну геліксову конформацію. На геометрію глікозидного зв'язку бокові ланцюги не впливають. Дослідження полісахаридів свідчать, що кор використовує взаємозв'язки між ланцюгами, що визначає кінцеву конформацію. Електронною дифракцією також підтверджено потрійну конформацію і показано, що ланцюги організовані в тригональні ґрати з гексагональною морфологією. Єдиний замісник водню при положенні 5 ксилозного кільця має вирішальний вплив на взаємодію внутрішньо- та міжланцюгових зв'язків. На основі підрахунку енергії можна припустити, що ксилозне кільце існує в загальній 4C_1 конформації крісла, що вказує на те, що в обох 1-4 та 1-3 глікозидно зв'язаних ксиланах зв'язок є дієкваторіальним (1e-4e). Внутрішньоланцюговий водневий зв'язок О (2')... О (6) підсилює О (3)... О (5') водневий зв'язок для того, щоб підтримати подвійну геліксову структуру, подібну стрічці, і О (6) Н водневого зв'язку в О (3) атоми в сусідніх ланцюгах з утворенням простирадла [6]. З цих досліджень витікає концепція щодо того, що глікозидний зв'язок геометрично підтримує основну конформацію. Дані щодо тривимірної конформації ксилану у водному оточенні можуть бути надзвичайно важливими в розумінні взаємодій ксилану і ксиланаз.



Продукція ксиланази

Відомо багато мікроорганізмів, які здатні продукувати ферменти, що деградують ксилан — гриби, актиноміцети і еубактерії. Основними факторами, необхідними для ефективної продукції ксиланолітичних ферментів, є вибір відповідного індукуючого субстрату і оптимальний склад поживного середовища. Важливість вільних від целюлаз ксиланазних систем в паперовій промисловості було поштовхом для досліджень в кореляції продукції ксиланаз і целюлаз мікроорганізмами. Нитчасті гриби є надзвичайно цікавими продуцентами ксиланаз, оскільки вони виділяють ферменти в середовище і рівні ферментів значно вищі, ніж такі дріжджів і бактерій. Але грибні ксиланазні зазвичай асоційовані з целюлазами. Селективна продукція ксиланаз можлива при вирощуванні видів *Trichoderma* і *Aspergillus* на ксилані як єдиному джерелі вуглеводу. Вирощування на целюлозі приводить до продукування обох ферментів, як целюлаз, так і ксиланаз, що може бути обумовлено присутністю слідових кількостей геміцелюлози в целюлозних субстратах. На механізми, які керують утворенням позаклітинних ферментів в залежності від джерела вуглецю, який присутній в середовищі, впливає доступність попередників білкового синтезу. Тому у деяких грибів, які ростуть на ксилані, не забрудненому целюлозою, при низьких співвідношеннях азот/вуглець в середовищі можуть продукуватися ксиланолітичні ферменти, які вільні від целюлаз. Однак, встановлено, що целюлозолітичні субстрати є необхідними для максимальної продукції ксиланазі *Thermomonospora curvata* [49], *Neurospora crassa* [15], *Clostridium stercorarium* [8]. Як було встановлено [36], дешеві геміцелюлозні субстрати, такі як кукурудзяні качани, пшеничні і рисові висівки, рисова солома, кукурудзяні стебла є найбільш придатними для утворення ксиланаз такими мікроорганізмами як *Aspergillus awamori*, *Penicillium purpurogenum* [28], *Bacillus sp. MCIB 59* [16]. Найбільш повно охарактеризовано ксиланазі *Aspergillus fumigatus* і *Trichoderma reesei* [3], причому остання проявляє максимальну серед грибів активність ($3350 \text{ MO} \cdot \text{мл}^{-1}$) [26, 36].

Схема очистки ендо-(1-4)- β -ксиланазі з культуральної рідини 3-х добової культури *Geotrichum candidum* ЗС була розроблена дослідниками [2]. Внаслідок очистки в 23 рази підвищена питома активність ендоксиланазі, яка становила $32,6 \text{ E/мг}$ білка, вихід активності — 14,4 %. Показана гомогенність ферменту при електрофорезі в ПААГ в присутності ДДС-натрію і визначена молекулярна маса — 60-67 кДа. Оптимальне значення рН при дії на карбоксиметилксилан (віскозиметричне визначення) 4,0, рН — 3,4. Фермент стабільний при рН 3,0—4,5 та 30—5 °С протягом 1 год. Максимальна осахарююча активність по відношенню до ксилану з деревини берези, зерна жита, пшеничної соломи була 10, 12 і 7,7 %, відповідно за 72 год, при концентрації ендоксиланазі 0,2 мг/мл. Ступінь гідролізу ксилану з деревини берези при концентрації фермента 0,4 мг/мл — 20 %. Початкові продукти гідролізу ксилану з деревини берези — ксилоолігосахариди зі ступінем полімерізації більше 4, кінцеві продукти — ксилобіоза, ксилотріоза, ксилоза і кислі ксилоолігосахариди.

Максимальна ксиланазна активність при ферментації на твердих середовищах була одержана для гриба *Schizophyllum commune* ($22700 \text{ MO} \cdot \text{г}^{-1}$), в той час як *Trichoderma hamatum* продукує $7000 \text{ MO} \cdot \text{г}^{-1}$ при використанні соломи пшениці як субстрату [25].

Ряд *Bacillus spp.* [16] і гриби [23] продукують ксиланазі, вільні від целюлаз. Здатність продукувати ксиланазу при ферментації на твердих середовищах показана



для *Bacillus licheniformis* [5]. Твердофазна ферментація нагадує природне мешкання мікроорганізмів і тому може бути ефективною в продукуванні деяких ферментів і метаболітів.

Хоча описано багато штамів, що продукують ксиланази, застосування для комерційного продукування на сьогодні обмежено, головним чином, *Trichoderma spp.* і *Aspergillus spp.* [28].

Дослідниками ідентифіковано ряд штамів, які продукують ксиланазу у великій кількості з підвищеною стабільністю при екстремальних умовах рН і температури. Так, з компостів ізольовано термофільний гриб *Melanocarpus albomyces*, який при вирощуванні в рідкому середовищі, яке містило цукровий очерет, продукував ксиланазу, вільну від целюлази [45]. Гриб був незвичайний, тому що ксиланазна активність індукувалась як геміцелюлозними субстратами, так і ксилозою, але не глюкозою. Шляхом фільтрації за молекулярною масою, а також іонообмінною хроматографією було одержано 4 ксиланази. Використовуючи такі ж самі умови очистки, було показано, що ксиланаз 1 не утворювалась при вирощуванні гриба на середовищі з ксилозою. Два фермента, мінорну ксиланазу ІА і основну ксиланазу ІІА, було очищено до гомогенного стану при вирощуванні продуцента на середовищі з цукровим очеретом. Обидві ксиланази були специфічні до полімеру β -1,4-ксилози, оптимуми активності були відповідно при рН 6,6 і 5–6 і температурі 65 °С. Ксиланази були стабільні між рН 5 і 10, при 50 °С протягом 24 год. Ксиланази звільняли з ксилану різного походження ксилобіозу, ксилотріозу і більш високомолекулярні олігомери.

На відміну від характерних для грибних ксиланаз кислих значень рН [7], актиноміцети і бактерії характеризуються близькими до нейтральних значеннями рН-оптимуму для росту і утворення ферменту. Так, з позаклітинного ферментативного комплексу *Bacillus polymyxa* [41] очищено до гомогенного стану 3 ендоксиланази ($X_{34}C$, $X_{34}E$ і X_{22}) з низькими молекулярними масами: 34, 34 і 22 кДа і лужними значеннями рІ — 9,3, >9,3 і 9,0, відповідно. $X_{34}C$ і $X_{34}E$ близькоспоріднені і є ізоформами одного і того ж ферменту. Три ферменти відрізняються деякими характеристиками, зокрема оптимумами рН і температури. Один з них, $X_{34}E$, характеризується високою термостабільністю. Значення V_{max} для $X_{34}C$, $X_{34}E$ і X_{22} ферментів на ксилані вівса складають 14,9, 85,5 і 64,0 $O \cdot mg^{-1}$, відповідно, та 16,1, 62,0 і 150,6 $O \cdot mg^{-1}$, відповідно, на ксилані березових дерев. Коли як субстрат використовували ксилан вівса, значення K_m склали 3,4, 2,4 і 1,9 $mg \cdot ml^{-1}$ для $X_{34}C$, $X_{34}E$ і X_{22} ферментів, відповідно, та 0,65, 6,3 і 0,32 $mg \cdot ml^{-1}$ значення K_m склали при використанні як субстрату ксилану березових дерев. Ферменти відносяться до ендоксиланаз, які не діють на розгалужені замісники. Ксилоза була єдиним продуктом гідролізу ксилану ксиланазами $X_{34}C$ і $X_{34}E$, але цей моносахарид не звільнявся під дією X_{22} ферменту. Однак, жоден з ферментів не був здатним деградувати ксилобіозу. Ксиланази $X_{34}C$ і $X_{34}E$ є новими ферментами, в той час як X_{22} відповідає вже описаним раніше ксиланазам бацил.

Ферменти актиноміцетів представляють практичний інтерес, тому що вони є термостабільними. Дослідники [47] ізолювали з ґрунтів Єгипту 2 штами — *Streptomyces albus* і *Streptomyces chromofuscus*, які проявили максимальну ксиланазну активність (13,25, 19,31 і 32,53, 43,01) на необробленій і обробленій TiO_2 рисовій соломі, відповідно. Активність підвищувалась, коли обидва ферменти вирощували на дріжджовому екстракті. Оптимальна продукція ксиланаз спостерігалась після 5 днів ферментації. Ксиланаз *Streptomyces chromofuscus* проявляла більшу відбілюючу



активність в порівнянні з ферментом *S. albus*. Вона підвищувала вивільнення редуруючих сахарів, які покращували здатність паперу до відбілювання.

Ендоксилазанний комплекс зі *Streptomyces sp.* В-12-2 був очищений і охарактеризований [17]. Встановлено, що при вирощуванні на ксилані пшениці стрептоміцет утворює 5 різних ксиланаз при відсутності значної активності целюлаз. На основі фізико-хімічних властивостей, ксиланазі можуть бути поділені на 2 групи: перша (хул 1а і хул 1б) включає ксиланазі з низькою молекулярною масою (26,4 і 23,8 кДа, відповідно), з рІ 6,5 і 8,3, відповідно. Ендоксилазні групи 1 нездатні гідролізувати арил- β -D-целобіозид, характеризуються низькою активністю щодо ксилотетраози (X_4) і обмеженою активністю щодо ксилопентаози, продукують мало або зовсім не продукують ксилозу і утворюють продукти, які мають високий рівень полімеризації зі складними субстратами. Ці ферменти, ймовірно, здійснюють трансглікозилювання. Друга група (хул 2, хул 3 і хул 4) включає ксиланазі з високою молекулярною масою (36,2, 36,2 і 40,5 кДа, відповідно) і низькими значеннями рН (5,4, 5,0 і 4,8, відповідно). Ендоксилазні групи 2 гідролізують арил- β -D-целобіозид, проявляють високі рівні активності відносно X_4 , повністю гідролізують ксилопентаозу з утворенням ксилобіози і ксилотріози, а також обмежену кількість X_4 і ксилози. Незважаючи на внутрішньогрупову подібність, кожний фермент проявляє унікальну дію і фізико-хімічні властивості. Встановлено, що хул 2 є високоглікозилюваною, а хул 1б повністю пригнічується *n*-гідроксимеркурібензоатом.

Більшість відомих на сьогодні ксиланаз проявляють оптимум активності при 50 °С або нижче і при кислих або нейтральних значеннях рН. З іншого боку, в процесі ферментативного відбілювання паперу необхідно, щоб ксиланазі працювали при підвищеній температурі і лужних значеннях рН [63], що робить використання термостабільних лужних ксиланаз більш привабливим. На сьогодні відомо декілька ксиланаз, які активні і стабільні при лужних значеннях рН і підвищеній температурі [42]. Так, дві ксиланазі — XylA і XylB були очищені з культуральної рідини алкаліфільного штаму *Bacillus sp.* AR-009 [20]. Молекулярні маси обох ферментів склали 23 кДа (XylA) і 48 кДа (XylB). Оптимум рН для XylA був 9 і для XylB — 9 і 10. Оптимальною температурою для активності XylA була 60 °С при рН 9 і 70 °С при рН 8. XylB проявляла оптимальну активність при 75 °С при рН 9 і 70 °С при рН 8. Обидва ферменти були стабільні в широкому спектрі рН і проявляли стабільність при інкубації при 60 і 65 °С при рН 8 і 9. Оптимум рН більшості відомих ксиланаз падає із підвищенням температури. XylB *Bacillus sp.* AR-009, ймовірно, є унікальною, тому що має лужний рН оптимум при підвищеній температурі. Подальші дослідження цього ферменту можуть надати інформацію щодо молекулярних основ стабільності і активності ксиланаз при цих умовах.

Накатура et al. [42] повідомили щодо продукції *Bacillus sp.* TAR-1 лужної ксиланазі, яка характеризується оптимумом температури 70 °С при рН 9 і 75 °С при рН 7.

Ферменти психрофільних організмів відрізняються від мезофільних більш низькою термостабільністю, але більш високою специфічною активністю при низьких і помірних температурах. Сучасна думка щодо цього питання полягає в тому, що вони мають підвищену здатність до пристосування, яка сприяє конформаційним змінам, необхідним для активності при низьких температурах, підвищуючи пристосованість і трансформацію субстратів при низьких енергетичних витратах. Вони характеризуються підвищеним числом обертів і фізіологічною



ефективністю (k_{cat}/K_m) при низьких і помірних температурах, а також більш низькою стабільністю. Дослідники [44] навели структуру ксиланази антарктичної бактерії *Pseudoalteromonas haloplanktis* при 1,3 А°. Конформація її відрізняється від відомих ксиланаз і може бути описана як $(\alpha/\alpha)_6$ бочечка. Дослідження різних параметрів, які можуть пояснити наявність адаптованих до холоду білків, показало, що білок характеризувався зменшеною кількістю сольових містків і підвищеною експозицією гідрофобних залишків. Кристалічні структури комплексу з ксилобіозою були одержані при розділенні 1,2 А°. Аналіз різних субстратзв'язуючих сайтів свідчить, що +3 і – 3 перебудовуються в порівнянні з родиною 8, в той час як ксилобіозний комплекс припускає наявність +4 субсайта. Зменшена кислотність субстратзв'язуючої ділянки і підвищена гнучкість ароматичних залишків, які покривають субсайт, можуть підвищити швидкість, при якій субстрат зв'язується. Знання структур психрофільних ферментів може забезпечити розуміння того, як їх стабільність при вищих температурах може бути покращена, в той час як їх здатність до пристосування в більш холодних умовах оточуючого середовища зберігається — ознака, яка робить їх корисними для багатьох біотехнологічних використань.

Психрофільна ксиланаза гідролізує ксилан до ксилотріози (X_3) і ксилотетраози (X_4) і, на відміну від ідентифікованих на сьогодні ксиланаз, діє шляхом інверсії аномерної конфігурації. Активність ферменту відносно X_5 надзвичайно низька, в той час як каталітична ефективність по відношенню до X_6 надзвичайно висока, що вказує на те, що фермент має значний субстратзв'язуючий сайт, який містить принаймні 6 ксилозозв'язуючих субсайтів.

Для мікробних ксиланаз характерна наявність однією субодиниці в білковій молекулі і їх молекулярні маси варіюють від 8 до 145 кДа [50]. Оптимальна температура для бактеріальних і грибних ксиланаз складає 40-60 °С. Грибні ксиланази менш термостабільні, ніж бактеріальні. Разом з тим, *Ceratocystis paradoxa*, мезофільний організм, продукує ксиланазу, яка стабільна протягом 1 год при 80 °С [13]. D-ксиланази, одержані з різних організмів, звичайно стабільні при широкому спектрі значень рН (3-10) і мають оптимум рН при 4-7. Ксиланази грибів, таких як *Aspergillus kawachii* [30], *Penicillium herque* [19] проявляють оптимум рН в кислій зоні (2-6). Ізоелектричні точки для ендоксиланаз різного походження варіюють від 3 до 10. Відомо, що бактерії здатні продукувати дві ксиланази — високомолекулярну кислоту і низькомолекулярну — лужну. Але такий тип взаємовідносин не є характерним для грибів, більш характерним для них є продукція низькомолекулярних лужних ксиланаз. Вивчення амінокислотного складу свідчить, що ксиланази різного походження містять як домінуючі аспарагінову, глютамінову кислоти, гліцин, серин і треонін.

Синтез глікозилованих ксиланаз складає загальне явище серед багатьох еукаріотних продуцентів [19]. Ксиланази прокаріотів, таких як *Clostridium sporosarum* [8], *Streptomyces sp.* [38], алкаліфільний, термофільний штам *Bacillus sp.* [16] є глікопротеїнами. Вуглеводні групи ковалентно приєднані до білка або присутні у вигляді комплексів, здатних до дисоціації. Глікозилювання сприяє стабілізації гліканаз в екстремальних умовах оточуючого середовища. Рекombінантні ксиланази, експресовані в *Escherichia coli* [39] з алкаліфільного, термофільного штаму *Bacillus sp.* [35] проявляли меншу стабільність при високій температурі і меншу здатність до зв'язування з ксиланом в порівнянні з ксиланазами вихідного



штаму, для яких властиво відсутність глікозилювання. В складі ксиланаз *Talaromyces byssochlamydoideus* УН-50 присутні залишки манози, глюкози і фукози [62]. Дослідники [60] припустили, що глікозилювання і протеоліз можуть вносити вклад в різноманітність ксиланаз.

В останні декілька років значний прогрес був досягнутий в клонуванні ряду ксиланолітичних генів у таких грибів як *Aspergillus swamori* [29], *A. nidulans* [31, 43], *A. oryzae* [32], *A. niger* [33], *Chaetomium gracile* [60], *Penicillium chrysogenum* [27], *Trichoderma viride* [56]. Крім ксиланолітичних генів, з аспергілів та *T. geesi* було ізольовано багато генів, які кодують допоміжні ферменти, такі як ацетилксилан естераза [24], [37], α -L-арабінофуранозідаза [21], арабіноксилан арабінофуранозідаза [22], α -глюкуронідаза [58], феруоїл естераза [57]. Це дозволило дослідити молекулярні механізми, які відповідають за регуляцію ксиланолітичних генів грибів [54].

Субстратна специфічність ксиланаз

Знання механізму дії ферментів, які деградують ксилан, були отримані з дослідів по вивченню субстратної специфічності, впливу на активність латеральних замісників, специфічності зв'язків, які розщеплюються, і кінцевим продуктам. Ксиланози грибного походження добре охарактеризовані. Головним чином, існує два їх типи — не діючі на розгалужені компоненти, які не звільнюють арабінозу, і такі, що діють на розгалужені компоненти і звільнюють арабінозу з бокових ланцюгів, окрім розщеплення зв'язків в головному ланцюзі [46]. Багато ксиланаз грибного походження, таких як *Neurospora crassa* [40] і *Aspergillus niger* [51] здатні звільняти арабінозу з арабіноксилану. Ендоксиланаз *Streptomyces roseiscleroticus*, як було показано, відноситься до дерозгалужуючих ферментів [47]. Однак, ксиланози *Trichoderma harzianum* [59] і *A. niger* не здатні звільнювати арабінозу з арабіноксилану. Присутність як дерозгалужуючих, так і недерозгалужуючих ксиланаз, знайдена у *T. koningii* і *Ceratocystis paradoxa*. Ксиланаз, ізольована з *A. awamori*, відщеплює арабінозні замісники в арабіноксиланах злаків, але не розщеплює зв'язки в основному ланцюзі ксилану [34].

Відомо, що наявність замісників у високорозгалужених полісахаридах впливає на ксиланазну активність. Однак, повідомлялось [14] про більшу афінність ферментів *A. niger* і *T. viride* до зв'язків головного ланцюга, біля точки розгалуження. Ксиланози також варіюють за своєю активністю в залежності від целюлозних субстратів. Деякі з них діють тільки на ксилан, в той час як неспецифічні ксиланози *Myrothecium verrucaria*, *Penicillium capsulatum* і *P. funiculosum* діють щодо карбоксиметилцелюлози і ксилану. Ослаблена специфічність деяких ксиланаз, як і обмежена (вузька) інших може бути обумовлена різницею між залишками, які залучаються до каталітичних груп. Взагалі, відомо, що ксиланози специфічні щодо зв'язків між моносахаридами [14]. Ендоглюканаз *C. thermocellum* гідролізує β -1,3 зв'язки ячменю, β -глюкану, а також β -1,4 зв'язки в інших субстратах. Вважають [11], що трансглікозилювання ендонуклеазами приводить до утворення продуктів, які містять ті ж самі зв'язки, що і субстрат, оскільки вони містять стереоспецифічні місця зв'язування на будь-якій стороні каталітичного сайту. Як повідомлялось [9], ксиланаз *Cryptococcus albidus* утворює 1,3- β -D-зв'язки завдяки реакції трансглікозилювання.



Практичне застосування

Ксиланази викликають підвищену увагу дослідників завдяки тому, що вони можуть бути використані замість хлорних хімікатів у відбілюванні паперу [56], особливо у зв'язку із забрудненням оточуючого середовища. Лімітований гідроліз геміцелюлоз паперу ксиланазами підвищує здатність лігніну до екстракції з паперу в послідовних процесах відбілювання, зменшуючи кількість хлорину (Cl_2) і гіпохлорину (ClO_2) для біовідбілювання, а також вивільнення хлорорганічних речовин. Природно існуючі мікробні штами, здатні для продукції ксиланаз, вільних від активності целюлаз, будуть дуже привабливими для такого застосування. Найбільш важливими ферментами, які необхідні для підвищення відбілювання паперу є ендо- β -ксиланази. Вони підвищують розщеплення осаженного ксилану, який утворився на поверхні целюлозних волокон після обробки. Це викликає підвищення проникності волокон деревини до відбілюючих хімікатів і дозволяє проходження великих фрагментів лігніну з деревини [4, 52]. Ксиланази мікроорганізмів, крім целюлозно-парперової промисловості, знаходять застосування в харчовій. Вони підвищують якість тіста і допомагають підняттю хліба. Крім того, ксиланази мікроорганізмів можуть бути корисними в біоконверсії лігноцелюлозного матеріалу в паливо і хімікати. Нещодавно виник значний промисловий інтерес до ксилану і його гідролітичному ферментативному комплексу, як додатка у виробництві харчування для тварин, людей, у виробництві напоїв, текстилю, у целюлозно-паперовій промисловості, виробництві етанолу і ксилітолу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Родионова Н. А., Безбородов А. М. //Прикл. биохимия и микробиология.-1997. — 33,5.— с. 469-489.
2. Н. А. Родионова, Н. В. Дубовая, Е. В. Энейская, Л. И. Мартинович, И. М. Грачева, А. М. Безбородов. Очистка и характеристика эндо-(1-4)- β -ксиланазы из *Geotrichum candidum* ЗС //Прикл. биохимия и микробиология.—2000.—36, 5. С. 535-540.
3. В. И. Элисашвили. Биосинтез и свойства целлюлаз и ксиланаз высших базидиомицетов //Прикладная биохимия и микробиология.—1993. — 29, 3.— С. 340-353.
4. Antonopoulos V. T., Hernandez M., Arias M. E., Mavrakos E., Ball A. S. The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* for bleaching of eucalyptus Kraft pulp //Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — 57. P. 92-97.
5. Archana A., Satyanarayana T. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid state fermentation //Enzyme Microbiol. Technol. —1997.—21.— P. 12-17.
6. Atkins E. D. T. Three dimensional structure, interactions and properties of xylans. In: Xylan and xylanases (Visser J., Beldman G., Someren M. A. K., Voragen A. G. J., Eds) 1992. Elsevier, Amsterdam, P. 21-39.
7. Ball A. S., McCarthy A. J. Production and properties of xylanases from actinomycetes //J. Appl. Bacteriol. —1989. — 66.— P. 439-444.
8. Berebger J., Frixon C., Creuzet N., Bigliardi J. Production, purification and properties of thermostable xylanase from *Clostridium stercorarium* //Can. J. Microbiol. — 1985. — 31. — P. 635 — 643.
9. Biely P., Vranska M. Synthesis and hydrolysis of 1,3- β -xylosidic linkages by endo-1,4- β -xylanase of *Cryptococcus albidus* //Eur. J. Biochem. — 1983.— 129. — P. 645-651.
10. Carpita N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses //Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biology. — 1996 — 47. P. 445-476.
11. Coughlan M. P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain hydrolyzing xylanases //In: Xylans and Xylanases (Visser J., Beldman G., Someren M. A. K., Voragen A. G. J., Eds.) 1992, Elsevier, Amsterdam. — P. 111-141.
12. Das N. N., Das S. C., Sarkar A. K., Mukherjee A. K. Lignin-xylan ester linkage in mesta fiber (*Hibiscus cannabinus*) //Carbohydr. Res. — 1984. — 129. — P. 197-207.



13. Dekker R. F. H., Richards G. N. Purification, properties and mode of action of hemicellulase-produced by *Ceratocystis paradoxa* //Carbohydr. Res. 1975. — 39.— P. 97-114.
14. Dekker R. F. H., Richards G. N. Hemicellulases: Their occurrence, purification, properties and mode of action //Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1976. — 32. P. 277-352.
15. Deshpande V., Lachke A., Mishra C., Keskar S., Rao M. Mode of action and properties of xylanase and β -xylosidase from *Neurospora crassa* //Biotechnol. Bioeng. —1986. — 26. — P. 1832-1837.
16. Dey D., Hinge J., Shendye A., Rao M. Purification and properties of extracellular endoxylanases from an alcalophilic thermophilic *Bacillus sp.*//Can. J. Microbiol. 1992. — 38. — P. 436-442.
17. Elegir G., Szakas G., Jeffries T. W. Purification, characterization and substrate specificities of multiple xylanases from *Streptomyces sp.* strain B-12-2 //Appl. Environ. microbiology. 1994. — 60, N7. — P. 2609-2615.
18. Ferreira-Filho E. X. The xylan degrading enzyme system. Brazilian J. Med. Biol. Res. — 1994. — 27. P. 1093-1109.
19. Funaguma T., Naito S., Morita M., Okumara M., Sigiura M/ hara A. Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herquei* Banier and sartory // Agricult. Biol. Chem. — 1991. — 55. — P. 1163-1165.
20. Gessesse A. Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alcaliphilic *Bacillus sp.* //Appl. Environ. Microbiol. — 1998.— 64, N9.— P. 3533-3535.
21. Gielkens M. M. C., Gonzales-Candelas L., Sanchez-Torres P., van de Vondervoort P., de Graaff L. H., Visser J., Ramon D. The *abiB* gene encoding the major α -L-arabinofuranosidase of *Aspergillus nidulans*: Nucleotide sequence, regulation and construction of a disrupted strain //Microbiology. — 1999. — 145. — P. 735-741.
22. Gielkens M. M. C., Dekkers E., Visser J., de Graaff L. H. Arabinoxylan degradation by fungi: Characterization of the arabinoxylan-arabinofuranohydrolase encoding genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* //Curr. Geneet. 1999. — 31. — P. 22-29.
23. Gilbert M., Breuil C., Saddler J. N. Characterization of the enzymes present in the cellulase system of *Thielavia terrestris* 255B //Biores. Technol.1992. — 39. — P. 147-154.
24. de Graaff L. H., Visser J., van den Broeck H. C., Strozyk F., Kormelink F. J. M., Boonman J. C. Cloning, expression and use of acetylxyylan esterases from fungal origin // Eur. Patent Application no. 0507369-A/7. — 1992.
25. Grajek W. Production of D-xylanases by thermophilic fungi using different methods of culture //Biotechnol. Lett. — 1987. — 9. — P. 353-356.
26. Haapala R., Linko S., Parkkinen E., Suominen P. Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam. Biotechnol. Tech. — 1994. — 8. — P. 401-406.
27. Haas H., Friedline E., Stoffler G., Redi B. Cloning and structural organization of a xylanase-encoding gene from *Penicillium chrysogenum* //Gene.- 1993. — 126. — P. 237-242.
28. Haltrich D., Nidetzky B., Kulbe K. D., Steiner W., Zupancic S. Production of fungal xylanases //Biores. Technol. 1996. — 58. — P. 137-161
29. Hessing J. G. M., van Rotterdam C., Verbakel J. M. A., Roza M., Maat J., van Gorcum R. F. M., van den Hondel C. A. J. J. Isolation and characterization of a 1,4- β -endoxyylanase gene of *Aspergillus awamori* //Curr. Genet. — 1994.— 26.— P. 228-232.
30. Ito K., Ogassawara J., Sugimoto T., Ishikawa T. Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachi* //Biosci. Biotechnol. Biochem. 1992. — 56. — P. 547-550.
31. Jose A., Gonsale P., Graaff L. H., de Visser J., Ramon D. Molecular cloning and expression in *Sacharomycea cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanases genes//Appl. Environ. Microbiol. — 1996. — 62. — P. 2179-2182.
32. Kimura T., Kitamoto N., Kito Y., Karita S., Sakka K., Ohmiya K. Molecular cloning of xylanase gene *xyn G1* from *Aspergillus oryzae* KBN616, a shoyu koji mold, and analysis of its expression//J. Ferment. Bioeng. — 1998.— 85.— P. 10-16.
33. Kinoshita K., Takano M., Koseki T., Ito K., Iwano K. Cloning of the *xynNB* gene encoding xylanase B from *Aspergillus niger* and its expression in *Aspergillus kawachi*//J. Ferment. Bioeng. — 1995. — 79. — P. 422-428.
34. Kormelink F. J. M., Searle-van Leeuwen M. J. F., Wood T. M., Voragen A. G. J. 1-4- β -D-Arabinoxyylan arabinofuranohydrolase: a novel enzyme in the bioconversion of arabinoxylan// Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1991. — 35. — P. 231-232.



35. Kulkarni N., Chauthaiwale J., Rao M. Characterization of the recombinant xylanases in *Escherichia coli* from an alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59//Enzyme Microbiol. Technol. — 1995. — 17. — P. 972-976.
36. Kulkarni N., Shendye A., Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases //FEMS Microbiology Reviews. — 1999. — 23, N4. — P. 411-456].
37. Margolles-Clark E., Tenkanen M., Soederlund H., Penttila M. Acetylxyylan esterase from *Trichoderma reesei* contains an active site serine residue and a cellulose-binding domain//Eur. J. Biochem. — 1996. — 237. — P. 553-560.
38. Marui M., Nakanishi K., Tsueneo Y. Immunological properties and constituent amino acids of three xylanases produced inductively from *Streptomyces* sp.// Agric. Biol. Chem. — 1985. — 23. — P. 60-66.
39. Merivuori H., Sands J. A., Montenecourt B. S. Effects of tunicamycin on secretion and enzymatic activities of cellulase from *Trichoderma reesei*//Appl. Microbiol. Biotechnol. 1985. —23. P. 60-66.
40. Mishra C., Keskar S., Rao M. Production and properties of extracellular endoxylanases from *Neurospora crassa*//Appl. Environ. Microbiol. 1984. — 48. — P. 224-228.
41. Morales P., Madarro A., Perez-Gonzales J. A., Sendra J. M., Pinaga F., Flors A. Purification and characterization of alkaline xylanases from *Bacillus polymyxa*//Appl. Environ. Microbiology. — 1993. — 59, N5. — P. 1376-1382.
42. Nakamura S., Ishiguro Y., Wakabayashi K., Nakai R., Aono R., Horikoshi K. Purification and characterization of a thermophilic alkaline xylanase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TAR-1//J. Mol. Catal. B Biocatal. — 1995. —1, N1.- P. 7-15.
43. Perez-Gonzalez J. A., van Peij N. N. M. E., Maccabe A. P. B. A., Ramon D., de Graaff L. H. Molecular cloning and transcriptional regulation of the *Aspergillus nidulans* xinD gene encoding a β -xylosidase// Appl. Environ. Microbiol. — 1998.— 64. — P. 1412-1419.
44. Petegem F. V., Collins T., Meuwis m-A., Gerday C., Feller G., Beeumen J. V. The structure of a cold-adapted family 8 xylanase at 1.3 Å resolution//J. Biol. Chem., 2003. — 278, N9. P. 7531-7539.
45. Prabhu k. A., Maheshwari R. Biochemical properties of xylanases from a thermophilic fungus, *Melanocarpus albomyces*, and their action on plant cell walls
46. Reily P. J. Xylanases: Structure and Function//Basic Life Sci. — 1981. 18. — P. 111-129.
47. Rifaat H. M., Nagieb Z. A., Ahmed Y. M. Production of xylanases by *Streptomyces* species and their bleaching effect on rice straw pulp//Appl. Ecology and Environmental Research. — 2005. — 4, N1. — P. 151-160.
48. Scarlbert A., Monties B., Lallemand J. Y., Guittet E., Rolando S. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw//Phytochemistry. —1985. — 24. — P. 1359-1362.
49. Stutzenberger F. J., Bodine A. B. Xylanase production by *Thermomonospora curvata*//J. Appl. Bacteriol. 1992. — 72. — P. 504-511.
50. Sunna A., Antranikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria//Crit. Rev. Biotechnol. — 1997. — 17. P. 39-67.
51. Takenishi S., Tsujisaka Y. Structure of the oligosaccharides from the enzymic hydrolyzate of rice straw arabinoxylan by a xylanase of *Aspergillus niger*//Agric. Biol. Chem. — 1973. — 37. — P. 1385-1391.
52. Techapun C., Poosaran N., Watanabe M., Sasaki K. Thermostable and alkali-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review// Process Biochemistry. — 2003. — 38. P. 1327-1340.
53. Timell T. E. Wood hemicelluloses//Carbohydr. Chem. — 1965. — 20. — P. 409-483.
54. Tsukagoshi N., Kobayashi T., Kato. Regulation of the amylolytic and (hemi)-cellulolytic genes in aspergilli J. Gen. Appl. Microbiol. 2001. — 47, N1. P. 1-19.
55. Ujiie M., Roy C., Yaguchi M. Low-molecular weight xylanase from *Trichoderma viride*// Appl. Environ. Microbiol. — 1991. — 57. — P. 1860-1862.
56. Viikari L., Kantelinen A., Sundquist J., Linko M. Xylanases in bleaching: from idea to industry//FEMS Microbiol. Rev. 1994. — 13. P. 335-350.
57. Vries R. P., Michelsen B., Poulsen C. H., Kroon P. A., van den Heuvel J. P. T. W., Faulds C. B. H., Williamson G., van den Hombergh J. P., Visser J. The fae genes from *Asper-*



gillus niger and *Aspergillus tubingensis* encode ferulic acid esterases involved in degradation of complex cell wall polysaccharides//Appl. Environ. Microbiol. — 1997. — 63. — P. 4638-4644.

58. Vries R. P., Poulsen C. H., Madrid S., Visser J. *aguA*, the gene encoding an extracellular α -glucuronidase from *Aspergillus tubingensis* is specially induced on xylose and not on glucuronic acid//J. Bacteriol. — 1998. — 180. — P. 243-249.

59. Wong K. K. Y., Tan L. U. L., Saddler J. N., Yaguchi M. Purification of the third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*//Can. J. Microbiol. — 1986. — 32. P. 570-574.

60. Wong K. K. Y., Tan L. U. L., Saddler J. N. Multiplicity of β -1,4-xylanases in microorganism: functions and applications//Microbiol Rev. 1988. — 52. P. 305-317.

61. Yoshino S., Oishi M., Moriyama R., Kato M., Tsukagoshi N. Two family G xylanase gene from *Chaetomium gracile* and their expression in *Aspergillus nidulans*//Curr. genet. — 1995. — 29. — P. 73-80.

62. Yoshioka H., Nagato N., Chavanich S., Nilubot N., Hayashida H. Purification and properties of thermostable xylanases from *Talaromyces byssochlamydooides* YH-50//Agric. Biol. Chem. 1981. — 45. P. 2425-2432.

63. Zamost B. L., Neilsen H. K., Starnes R. L. Thermostable enzymes for industrial application//J. Ind. microbiol. — 1991. — 8. — P. 71-82.

Л. Д. Варбанец, Н. В. Борзова

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,
ул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП Д03680, Україна, тел.: 8 (044)
526 23 39, e-mail: varbanets@serv. imv. kiev. ua

КСИЛАНАЗЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Реферат

В обзоре приведены данные о ксиланазах — ферментах, которые принимают участие в расщеплении природных полисахаридов, в частности, ксиланов. Показано, что в зависимости от происхождения, структура и химический состав ксиланов в значительной степени варьирует, что обуславливает участие в их расщеплении, кроме ксиланаз, и других ферментов, таких как арабинофуранозидазы, β -глюкуронидазы, эстеразы. Показано, что способность продуцировать ферменты, которые деградируют ксилан, свойственна грибам, актиномицетам и зубактериям. Ксиланазы разного происхождения отличаются физико-химическими свойствами, субстратной специфичностью. Показана возможность использования ксиланаз в целлюлозо-бумажной, пищевой промышленности, в производстве хлеба, напитков, текстиля.

Ключевые слова: ксиланазы, микроорганизмы, субстратная специфичность, физико-химические свойства, практическое использование.



L. D. Varbanets, N. V. Borzova

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, Academ. Zabolotny str.,
154, Kyiv, Ukraine, tel.: 8 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

XYLANASES OF MICROORGANISMS

Summary

Xylanases, enzymes which participate in destruction of natural polysaccharides and xylans were discussed. It was established that the origin, structure and chemical composition of xylans are varied. This fact makes for participation in splitting except xylanases also such enzymes as arabinofuranosidases, β -glucuronidase, esterase. It was shown that the ability to produce enzymes degrading xylan is characteristic for fungi, actinomycetes, eubacteria. The xylanases of different origin are varied by physico-chemical properties, substrate specificity. Possibility to use xylanases in pulp and paper industry, food industry, baking of bread, producing of beverages and textile has been proved.

Key words: xylanases, microorganisms, substrate specificity, physico-chemical properties, practical use.



Є. В. Кузьмінський, П.І. Гвоздяк, Н. Б. Голуб

Кафедра екобіотехнології та біоенергетики Національного технічного університету України “КПІ”, пр. Перемоги 37, 4 корпус, к.182, Київ, 03056, Україна;
тел/факс: 8 (044) 24 168 84; e-mail: kuzminskiy@fbt.ntu-kpi.kiev.ua; ecobio@i.com.ua,
<http://www.ntu-kpi.kiev.ua/keb>

БІОПАЛИВНІ ЕЛЕМЕНТИ — ПРОБЛЕМИ І ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ І. ФЕРМЕНТНІ ПАЛИВНІ ЕЛЕМЕНТИ

В оглядовій роботі здійснено аналіз стану, розглянуто проблеми та визначено перспективи розвитку біопаливних елементів — електрохімічних пристроїв, в яких за допомогою мікроорганізмів здійснюється пряме перетворення хімічної енергії різноманітних речовин (вуглеводів, жирів, білків та ін.) в електричну в результаті біохімічних трансформацій.

К л ю ч о в і с л о в а : ферментні паливні елементи, прокаріоти, еукаріоти, медіатори, анод, катод.

Сьогодні практично всі розуміють, наскільки злободенно стоять питання енергозабезпечення, раціонального використання природних ресурсів та збереження довкілля [3, 5, 6]. Однак взаємини цивілізації та біосфери і на початку третього тисячоліття розглядаються як протистояння двох багато в чому ворожих світів — “світу людини” і “світу природи”. Саме біотехнології, як технології, що базуються на використанні законів розвитку живої природи, можуть стати одним із тих засобів, завдяки яким людство повинно зменшити техногенне навантаження на біосферу, підтримати безпечні умови свого існування і отримати в достатній кількості енергію принципово нового походження. Тому все більше уваги світової спільноти приділяється пошуку і використанню альтернативних копалин і, перш за все, відновлюваних джерел енергії (ВДЕ). Так, Європейський Союз ухвалив рішення підвищити до 2020 року частку використання відновлюваних джерел енергії з сьогоднішніх 6,5 % до 20 %, а частку біопалива у загальному споживанні транспортного палива—до 10 %. У 2006 році у світовий сектор відновлюваної енергетики й енергозбереження інвестовано близько 100 млрд. доларів США, що на 20 % більше, ніж у 2005 році. Хоча близько 70 % інвестицій реалізовано в США та Євросоюзі, відсоток країн, що впроваджують ВДЕ, зріс з 15 % до 21 % [2]. При цьому пріоритетними сферами відновлюваної енергетики залишаються технології виробництва біопалива поряд з вітро- та сонячною енергетикою. І для України саме біоенергетика має найбільші переваги, якщо розглядати економічно обґрунтований потенціал.

Вирішення таких складних завдань відбувається, звичайно, на стиках декількох наук. Продуктивність таких міждисциплінарних контактів демонструє біоенергетика: з одного боку, це наука про загальні закономірності перетворення енергії у живих системах, а з іншого — напрям альтернативної енергетики, що пов’язаний з використанням відновлюваних джерел енергії біологічного походження.



Наглядним прикладом використання напрацьованих природою підходів до вирішення енергетичних проблем людства є біопаливні елементи (Біо-ПЕ; biofuel cell — BFC) — пристрої, в яких енергія хімічних зв'язків безпосередньо перетворюється в електричний струм в результаті біохімічних перетворень [1, 4]. Біопаливні елементи потенційно можуть вирішити, окрім енергетичної, й екологічні проблеми утилізації відходів, оскільки ферментні системи мікроорганізмів здатні до деструкції практично всіх природних і синтетичних сполук. Наприклад, при роботі таких установок може відбуватися очищення стоків і одночасна генерація електричного струму. Так, за прогнозом американських вчених з Пенсільванського університету, масштабне використання Біо-ПЕ для очищення стічних вод з одночасним отриманням електричної енергії дозволить США щорічно економити близько 25 млрд. доларів [16]. Своє застосування Біо-ПЕ можуть знайти і в електроніці та медицині, оскільки ці галузі вимагають мініатюрних джерел енергії, які здатні витримувати тривалу експлуатацію без втручання людини.

Мета даної роботи — аналіз стану, розгляд і визначення проблем та перспектив розвитку новітнього напрямку технічної біоенергетики — біопаливних елементів (зокрема ферментних Біо-ПЕ) — пристроїв, в яких за допомогою мікроорганізмів здійснюється пряме перетворення хімічної енергії різноманітних речовин (вуглеводів, жирів, білків та ін.) в електричну в результаті біохімічних трансформацій.

1. Загальна характеристика ферментних біопаливних елементів

За біоактивною складовою Біо-ПЕ поділяють на ферментні біопаливні елементи (ФПЕ; enzymatic fuel cell — EFC) та мікробні біопаливні елементи (МПЕ; microbial fuel cell — MFC). У першому випадку застосовуються виділені ферменти, а у другому — цілі мікробні клітини. Незважаючи на певні переваги та недоліки, кожен з цих типів Біо-ПЕ здатен зайняти свою нішу у вирішенні енергетичних проблем.

Принцип роботи ФПЕ досить схожий з принципом роботи хімічних паливних елементів (ХПЕ). Слід зазначити, що, крім різниці в природі каталізатора, в ФПЕ умови перебігу реакцій істотно м'якші (близькі до нейтрального значення рН розчинів, кімнатна температура). Кількість електрики, яку виробляють ФПЕ, як правило, порівняно із такою для ХПЕ. Для пояснення принципу дії ФПЕ на рис.1 наведено катодний і анодний напівелемент, котрий містить фермент, медіатор і субстрат [1]. Медіатор (переносник зарядів) являє собою природний або штучний електронний акцептор.

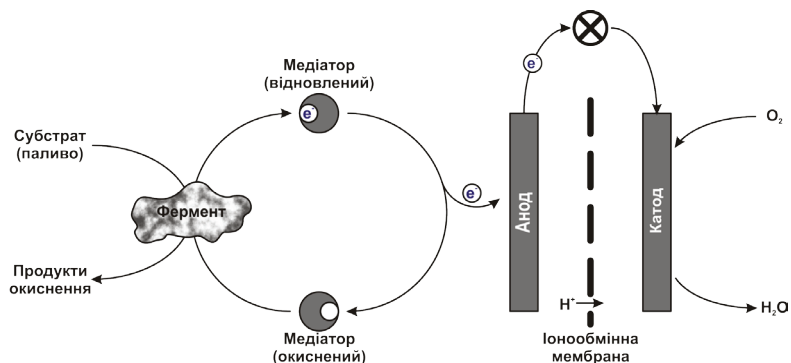
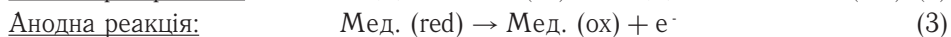


Рис. 1. Схематичне зображення ФПЕ
Fig. 1. Schematic picture of EFC

Як приклад можна навести систему реакцій окиснення метанолу до формальдегіду за допомогою ферменту метанолдегідрогенази в ФПЕ.



Метанолдегідрогеназа перетворює метанол у формальдегід і H^+ у присутності коферменту НАД^+ , який після отримання двох електронів, переходить у відновлену форму. Наступне окиснення нікотинамідаденіндинуклеотиду (відновлена форма — НАДН) відбувається за допомогою медіатора (реакція, яка схожа на реакцію на клітинному рівні). Окиснення медіатора і передача електронів у зовнішній ланцюг відбуваються на аноді відповідно до рівняння (3). При цьому нікотинамідаденіндинуклеотид (окиснена форма — НАД^+) і медіатор у реакціях практично не витрачаються. При певному виборі катодної частини елемента H^+ вступає у реакцію з O_2 на поверхні катода, що призводить до споживання електронів і утворення води.



Сумісний перебіг анодної і катодної реакцій призводить до виникнення струму в зовнішньому електричному колі.

2. Анодний напівелемент ФПЕ

Процес електрохімічного окиснення субстрату може каталізуватися ферментами з наступним перенесенням електрона на електрод. Різні класи ферментів-окиснювачів вимагають власних молекулярних “інструментів” для встановлення такого електричного контакту [9, 24]. Медіатори, які переносять електрони між активними центрами ферментів і електродами, як правило, необхідні для флавінаденіндинуклеотид-залежних оксидаз, наприклад, для глюкозооксидази (ГОД). НАДФ -залежні дегідрогенази, наприклад, лактатдегідрогеназа (ЛДГ) для встановлення електричного контакту з електродом вимагають присутності кофактора НАДФ^+ і каталітично активного стосовно НАДФН анода, що забезпечує регенерацію НАДФ^+ .

Аноди, які використовують біоелектрокаталітичне окиснення НАДФН . У біологічних системах нікотинамідні редокс кофактори (НАД^+ і НАДФ^+) відіграють важливу роль у транспорті електронів. Вони являються переносниками електронів і активують тим самим біокаталітичні функції дегідрогеназ, до числа яких належить більшість редокс-ферментів.

Застосування НАД^+ -залежних ферментів (наприклад, лактатдегідрогенази, ЕС 1.1.1.27; алкогольдегідрогенази, ЕС 1.1.1.71; глюкозодегідрогенази, ЕС 1.1.1.47) дозволяє використовувати у якості палива такі органічні субстрати, як лактат, спирти, глюкозу. Біокаталітичне окиснення цих субстратів вимагає ефективного процесу електрохімічної регенерації НАД^+ -кофакторів в анодній частині біопаливного елемента.

У водному розчині при рН 7,0 термодинамічний окисно-відновний потенціал (E°) для $\text{НАД}^+ / \text{НАДН}$ становить -0,56 В (відносно нормального каломельного електрода (НКЕ)), що є дещо зависоким для здійснення анодного процесу. Електрохімічні аспекти НАДФН інтенсивно досліджують, і було показано [9,15], що процес електрохімічного окиснення є практично незворотним і відбувається за

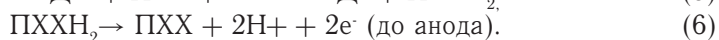
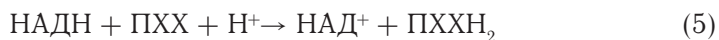


високих перенапруг (близько 0,4 В; 0,7 В та 1 В відносно НКЕ на графітовому, Pt і Au електродах, відповідно). Значна адсорбція НАДН і НАД⁺ (наприклад, на Pt, Au, скловуглеці та пірографіті), як правило, “отрує” електродну поверхню і перешкоджає процесам окиснення. Крім того, НАД⁺ є інгібітором прямого окиснення НАДН, а адсорбована НАДН може окиснюватися до небажаних продуктів (наприклад, до димера НАД⁺), що призводить до руйнування кофактора. Таким чином, електрохімічне окиснення НАДН без каталізатора непридатне для використання в ФПЕ. Ефективне електроокиснення НАДН потребує подальшого розвитку медіаторного електрокаталізу.

При опрацюванні модифікованих електродів з медіаторами використовуються різні методи їх іммобілізації — молекули медіатора можуть бути адсорбовані безпосередньо на поверхні електрода, включені в шар полімеру, або ковалентно зв’язані з функціональними групами на поверхні електрода [10]. Так, у роботі [19] досліджувався ФПЕ на основі електрокаталітичної регенерації НАД⁺ на модифікованому аноді. Глюкозодегідрогеназу *E. C. 1.1.1.47*) іммобілізували у пористому склі, розташованому в анодній частині ФПЕ. Фермент окиснював субстрат (глюкозу), виробляючи при цьому відновлену форму кофактора (НАДН). Відновлений кофактор за рахунок дифузії досягав поверхні анода, де окиснювався до НАД⁺. Біокаталітичний анод був з’єднаний із платиновим катодом, на якому відбувалося відновлення іонів водню. ФПЕ продемонстрував наступні характеристики: $V = 300$ мВ та $i = 220$ мА/см² протягом декількох годин.

Ковалентне зв’язування окисно-відновних медіаторів для утворення мономолекулярних шарів, що самоорганізуються, має важливу перевагу при створенні багатокомпонентних систем [20]. Піролохінолінхінон (ПХХ; PQQ) можна ковалентно зв’язати з аміногрупами мономолекулярного шару цистаміну, утвореного на поверхні золота. Отриманий у такий спосіб електрод продемонстрував високу електрокаталітичну активність окиснення НАДФН, особливо в присутності катіонів Ca²⁺, що є активаторами реакції [12]. Кулонометричний аналіз редокс-хвиль хінону показав, що заповнення поверхні електрода ПХХ відповідає значенню $1,2 \cdot 10^{-10}$ моль · см⁻², що є типовим для мономолекулярного шару, а знайдене значення константи швидкості перенесення електрона склало $k = 8$ с⁻¹.

У присутності НАДН спостерігається анодний струм, що передбачає ефективне електрокаталітичне окиснення кофактора:



Висока вартість НАДФН / НАДФ⁺ кофакторів вимагає їх іммобілізації разом з ферментами при практичному застосуванні. Проте, ковалентне зв’язування природних НАДФ⁺-кофакторів з органічними матеріалами приводить до значного зниження їх функціональної активності. Рухливість кофакторів украй необхідна для ефектної взаємодії з ферментами, тому багато уваги приділяється синтезу штучних аналогів НАДФ⁺-кофакторів, функціональні групи яких мають бути віддалені від біоактивного центра кофактора за допомогою вуглецевих містків [8,18]. Такий подовжувач звичайно пов’язаний з N-6 положенням у молекулі НАДФ⁺ і забезпечує деяку гнучкість для біоактивної частини кофакторів, дозволяючи їм взаємодіяти з молекулами ферменту. З різними ферментами було вивчено взаємозв’язок між структурою і активністю модифікованих НАДФ⁺- похідних і показана можливість



заміни природної НАДФ⁺ іі штучними аналогами. Високоєфективний анод повинен містити в собі три об'єднані і електрично пов'язані компоненти: фермент, НАДФ⁺-кофактор, що з ним взаємодіє, і каталізатор, що забезпечує швидку регенерацію кофактора.

Аноди, модифіковані флавоензимами. Електричний зв'язок редокс-ферментів, які не мають безпосереднього електричного контакту із електродами, можна встановити, використовуючи синтетичні переносники заряду як проміжні ланки між редокс-центром ферменту і електродом [11]. Загальна електрична ефективність електродів, модифікованих ферментами, залежить не тільки від властивостей медіатора при переносі електронів, але й від ланок передачі, присутніх у цілій системі. Дифузійне переміщення електронів використовується для їх транспортування між ферментами-окиснювачами і анодами біопаливних елементів, здійснюючи, таким чином, біоелектрокаталітичне окиснювання органічних палив (таких як метанол).

Формування шару ферменту на моношарі електронного медіатора ФАД було реалізовано відтворенням апоглюкозооксидази (апо-ГО) на поверхні електрода з нанесеним моношаром ФАД (Рис.2) [14, 23].

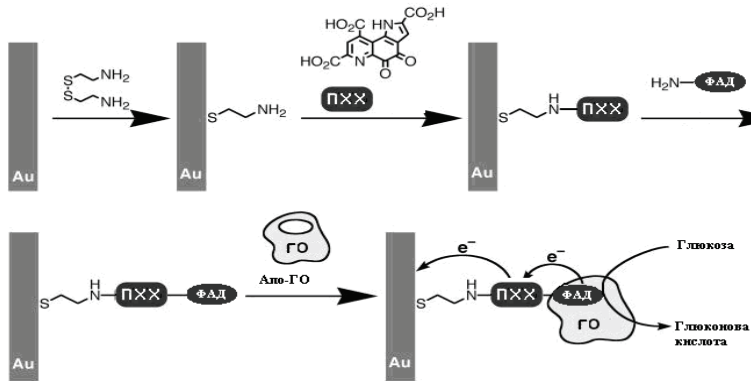


Рис.2. Поверхнє відтворення апо-глюкозооксидази на мономолекулярному шарі ПХХ-ФАД, отриманому на золотому електроді
(геометрична площа близько 0,4 см², коефіцієнт шорсткості близько 20) [23]

Fig. 2. Surface reconstitution of apoglucose oxidase onto monomolecular PQQ-FAD layer bound to the gold electrode
(geometrical area nearly 0,4 cm², roughness factor nearly 20) [23]

Піролохінолінхінон ковалентно зв'язувався з моношаром основи цистаміну на поверхні золотого електрода, з наступним приєднанням N-6-(2-аміноетил)-ФАД до груп ПХХ. Апо-ГО (отримана екстракцією природного ФАД-кофактора із глюकोзооксидази (ЕС 1.1.3.4)) була потім відтворена на структурі моношару ПХХ-ФАД із групами ФАД, утворюючи структурно упорядкований, іммобілізований на електроді біокаталізатор з покриттям поверхні $1,7 \cdot 10^{-12}$ моль · см⁻². Такий функціалізований ферментом і ПХХ-ФАД електрод продемонстрував біоелектрокаталітичні властивості.

На рис.3 відображені циклічні вольтамперограми цього електрода за відсутності і у присутності глюкози (криві а і б, відповідно), з яких слідує, що при наявності субстрату — глюкози спостерігається анодний струм, який можливий лише за наявності електричного контакту між відтвореним ферментом і поверхнею електрода.

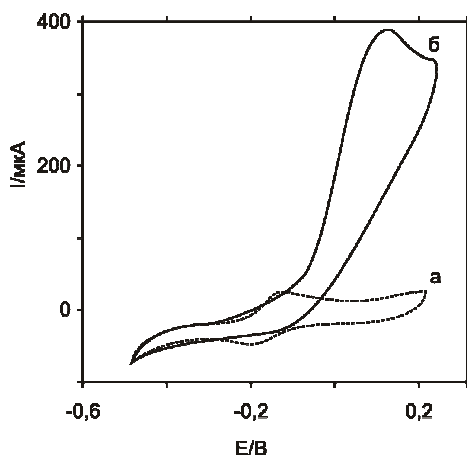
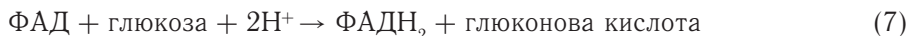


Рис.3. Циклічні вольтамперограми, отримані на золотому електроді, модифікованому відтвореною глюкозооксидазою на моношарі ПХХ-ФАД:
 а – за відсутності глюкози, б – із глюкозою (80мМ). Вимірювання проведено при 35 °С під аргонем в 0,1М фосфатному буферному розчині і за швидкості розгортки у 5 мВ · с⁻¹ [14]

Fig. 3. Cyclic voltammograms obtained on a gold electrode modified by reconstituted glucose oxidase on PQQ-FAD monolayer:
 a – without glucose, b – with glucose (80 mM). The measurement was performed at 35 °C under argon in 0,1 M phosphate buffer solution and by potential scan rate 50 mV.s⁻¹ [14]

Електрод постійно окиснює ПХХ групи, що перебувають на периферії ферменту, а окиснювання ФАД активує біоелектричне окиснення глюкози (рівн.7–9). Величина сумарного електричного струму визначається швидкістю циклу відновлення ФАД субстратом.



Контрольні дослідження показали, що без ПХХ система не демонструє взаємодії з поверхнею електрода (перенесення електронів відсутнє), що є доказом ключової ролі ПХХ при електроокисненні глюкози.

3. Катодний напівелемент ФПЕ

Біокаталітичне відновлення окиснювачів (наприклад, таких як O₂, H₂O₂ та ін.) приваблює до себе набагато менше уваги, порівняно з біокаталітичним окиснюванням палив. Проте, при створенні біопаливного елемента важливо також підібрати і ефективний катод для відновлення окиснювача, щоб забезпечити ефективне функціонування як анода, так і всієї електрохімічної системи в цілому – Біо-ПЕ. Традиційні катоди ХПЕ, на яких відбувається відновлення O₂, звичайно не сумісні з анодами Біо-ПЕ, оскільки для їх функціонування обов'язковим є висока температура і тиск. Тому біокаталітичні процеси відновлення на катоді варто розглядати як спосіб досягнення кінцевої цілі – створення Біо-ПЕ.



Пероксид водню є сильним окиснювачем ($E^\circ = 1,535$ В відносно нормального каломельного електрода — НКЕ), однак його електрохімічне відновлення відбувається за дуже великої перенапруги. Біоелектрокаталітичне відновлення H_2O_2 відбувається в присутності різних пероксидаз (наприклад, пероксидази хрому, ЕС 1.11.1.7) [21]. Мікропероксидаза-11 (МП-11) — це олігопептид, який складається з 11 амінокислот і ковалентно зв'язаний з гемом Fe (III)-протопорфірином-IX [7]. Даний олігопептид утворюється в реакції контрольованого гідролітичного розщеплення цитохрому С і є мікрооточенням активного центра цитохрому. МП-11 має ряд переваг порівняно зі звичайними пероксидазами — має набагато менший розмір, високу стійкість і демонструє здатність до прямої електричної взаємодії з електродами за рахунок доступного гему. Було проведено ковалентне зв'язування МП-11 до самоорганізованого мономолекулярного шару цистаміну на поверхні золотого електрода [17]. Структура МП-11 дозволяє реалізувати два шляхи зв'язування цього олігопептиду з вихідним моношаром цистаміну: зчеплення карбоксильних груп протопорфірину IX з поверхнею моношару та зв'язування залишків карбоксильних груп олігопептиду з групами цистаміну. Два ці варіанти об'єднання мають подібні стандартні потенціали $E^\circ = -0,40$ В відносно НКЕ. Швидкості електронного перенесення для цих режимів зв'язування були визначені кінетичним методом за використання хроноамперометрії [13], і їхнє відношення виявилось приблизно рівним 1:1. Швидкості міжфазного перенесення електронів між гемом і електродом становили $8,5$ s^{-1} і 16 s^{-1} , відповідно.

Пряме електрохімічне відновлення молекулярного кисню відбувається при дуже великих перенапругах (наприклад, на золотому електроді, рН 7,0 при $-0,3$ В відносно НКЕ). Тому для ефективного використання процесу відновлення кисню у паливному елементі потрібні каталізатори. Відновлення O_2 до води, яке супроводжується перенесенням чотирьох електронів без утворення перекисів і надперекисів, є основною невирішеною проблемою при створенні біопаливних елементів, через те, що ці хімічно активні інтермедіати згубно впливають на біокаталізатори системи.

Біокаталітичні системи, які складаються з ферментів та відповідних їм медіаторів електронного переносу (такі як білірубіноксидаза, ЕС 1.3.3.5 [22], грибка лаккази, ЕС 1.10.3.2, з медіатором 2,2'-азин-біс-(3-етилбензотіазолін-6-сульфонат)), здатні ефективно біокаталізувати електровідновлення O_2 до H_2O при потенціалі $0,4$ В відносно НКЕ, істотно знижуючи перенапругу. Однак ці системи, що складаються з розчинених ферментів і медіаторів, функціонують у дифузійному режимі, що неприпустимо для промислового використання. Ферментні системи, які сконструйовані із шарів, більш перспективні для використання у катодах Біо-ПЕ. Цитохром С, у якому є єдина тіольна група 102-цистеїнового залишку (дріжджовий ізо-2-цитохром із *Saccharomyces cerevisiae*), було нанесено у вигляді моношару методом ковалентної зшивки тіольних груп з мономолекулярним шаром малеїміда на поверхню золотого електрода. Квазізворотня циклічна вольтамперограма, отримана на даному електроді ($E^\circ = 0,03$ В відносно НКЕ), вказує на прямий електричний контакт гема протеїну з електродом, що, ймовірно, є результатом структурного групування гема протеїну з золотом.

За біоактивною складовою Біо-ПЕ поділяють на ферментні та мікробні біопаливні елементи. У першому випадку застосовуються виділені ферменти, а у другому цілі



мікробні клітини. Незважаючи на певні переваги та недоліки, кожен з цих типів Біо-ПЕ здатен зайняти свою нішу у вирішенні енергетичних проблем.

Принцип роботи ферментних біопаливних елементів досить схожий з принципом роботи хімічних паливних елементів. Слід зазначити, що, крім різниці в природі каталізатора, в ФПЕ умови перебігу реакцій істотно м'якші (близькі до нейтрального значення рН розчинів, кімнатна температура). Кількість електрики, яку виробляють ФПЕ, як правило, порівняна із такою для ХПЕ.

Для ферментних біопаливних елементів, поряд з можливістю використовувати в них окремий субстрат із суміші та відносною легкістю іммобілізації ферменту, що дозволяє легко створювати проточні схеми функціонування, характерним також є низка таких недоліків: вони мають високу вартість, бо отримання, виділення і очищення ферментів пов'язане із суттєвими матеріальними і часовими витратами; мають обмежений термін роботи у зв'язку з постійною інактивацією ферментів; ферментам притаманна вузька субстратна специфічність і схильність до інгібування, що обмежує їх застосування для мультикомпонентного середовища (наприклад, відходів). Усе перераховане накладає достатньо жорсткі вимоги як до їх апаратурного оформлення, так і до складу субстрату.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дебабов В. Г. Производство электричества микроорганизмами // Микробиология.— 2008.— № 2. — С. 149 — 157.
2. Конеченков А. Дев'ять мільярдів євро від відновлюваної енергетики // Зелена енергетика. — 2007. — № 4(28). — С. 4-11.
3. Кудря С. О. Тенденції розвитку відновлюваної енергетики. — Матеріали доповіді на Днях інформації “Енергоефективність — шлях до економічної безпеки України”. 20 грудня 2007р. — К.: ДНТБ України, 2007.— 7с.
4. Кузьмінський Є. В., Голуб Н. Б., Лесько І. В. Електрохімічні аспекти біоенергетики // Відновлювана енергетика. —2006.— № 3.— С. 92-99.
5. Социально-экономический потенциал устойчивого развития: Учебник / Под ред. проф. Л. Г. Мельника (Украина) и проф. Л. Хенса (Бельгия). — Суми: ИТД “Университетская книга”, 2007. — 1120 с.
6. Екологія та природні багатства України. Загальноукраїнський проект під патронатом Комітету Верховної Ради України з питань екологічної політики, природокористування та ліквідації наслідків Чорнобильської катастрофи, Міністерства охорони навколишнього природного середовища.- К.: Видавництво „Новий світ”, 2004. — 320 с.
7. Adams P. A. Microperoxidases and Iron Porphyrins in “Peroxidases in Chemistry and Biology”, CRC Press, Boca Raton.—1991.— v. 2.— Chapter 7.— P. 171-200.
8. Bardea A., Katz E., Buckmann A. F., Willner I. HAD⁺ dependent enzyme electrodes: electrical contact of cofactor dependent and electrodes// J. Amer. Chem. Soc. — 1997.— v.119.—P.9114 — 9119.
9. Bartlett P. N., Tebbutt P., Whitaker R. C. Kinetic aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry// Prog. Reaction Kinetics/ —1991.— v.16. — P. 55-155.
10. Bennetto H. P., Ewart D. K. Charge and Field Effect in Biosystems / Eds. M. J. Allen, S. F. Cleary, F. M. Hawkrigde. N. Y.: Plenum Press.— 1989. — 339р.



11. *Davis J. B., Yarbrough H. F.* Preliminary experiments on a microbial fuel cell// Science. – 1962. – v. 137. – P. 615-616.
12. *Katz E., Lotzbeyer T., Schlereth D. D., Schuhmann W., Schmidt H. L.* Electro catalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzyme at gold and platinum electrode surface modified with a monolayer of pyrroloquinoline quinine. Effect of Ca^{2+} ions// J. Electroanal. Chem. – 1994. – v. 373. – P. 189-200.
13. *Katz E., Willner I.* Kinetic separation of amperometric responses of microperoxidase MP-11 and a cystamine to the monolayer structure and composition / Amer. Chem. Soc. Langmuir.– 1997.– v. 13. N 13.– P. 3364-3373.
14. *Katz E., Riklin A., Heleg-Shabtai V., Willner I., Beckmann A. F.* Glucose oxidase electrodes via reconstitution of the apoenzyme: tailoring of novel glucose biosensors // Anal. Chim. Acta. – 1999. – v. 385.– P.45-48.
15. *Kim B. H., Kim H. J., Hyun M. S., Park D. H.* Direct electrode reaction of Fe (III) reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. // J. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – v.9a. – P. 127-131.
16. *Logan B. E.* Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation. // Wat. Sci. Technol. – 2005. – v.52. – N 1-2. – P. 31-37.
17. *Lötzbeier T., Schuhmann W., Katz E., Falter J., Schmidt H. L.* Direct electron-transfer between the covalently immobilized enzyme microperoxidase MP-11 and a cystamine modified gold electrode// J. Electroanal. Chem. – 1994. – v. 377. – P. 291-294.
18. *Maurice M., Soupe J.* Spectral, biochemical and electrochemical properties modified nicotinamide adenine dinucleotides// New J. Chem. – 1990. – v. 14. –P. 301-304.
19. *Persson B., Gorton L., Johansson G., Torstensson A.* Biofuel cell based on glucose and microperoxidase-11// Enzyme Microb. Technol. – 1985. – N 7.– P. 549-560.
20. *Riklin A., Katz E., Willner I., Stocker A., Buckmann A. F.* Improving enzyme electrode contact redox modifications kofactors //Nature. – 1995. – v. 376. – P. 672-675.
21. *Ruzgas T., Csöregi E., Emneus J., Gorton L., Marko-Varga G.* Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application //Anal. Chim. Acta.– 1996. – v. 330. – N 1.– P. 123-138.
22. *Tsujimura S., Tatsumi H., Ogawa J., Shimizu S., Kanok S., Keda T.* Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutral pH using bilirubin oxidase as an enzyme and 2,2'-azino-bis-9ethyl benzoathiazolin-6 sulphonate) as an electron-transfer mediator// J. Electroanal. Chem. – 2001. – V.496. – N 1. – P. 69-75.
23. *Willner I., Heleg-Shabtai V., Blonder R., Katz E., Tao G., Beckmann A. F., Heller A.* Electrical wiring of glucose oxidase by reconstitution of FAD modified monolayers assembled onto Au electrodes //J. Am. Chem. Soc. – 1996. – v. 118. – P. 10321-10322.
24. *Willner I., Katz E.* Integration of layered redox-proteins and conductive supports for bioelectronic applications // Angew. Chem. Int. Ed. – 2000. – v. 39. – P. 1180-1218.

Е. В. Кузьминский, П. И. Гвоздяк, Н. Б. Голуб

Кафедра экобиотехнологии и биоэнергетики
Национального технического университета Украины “КПИ”,
пр. Победы, 37, 4 корпус, к.182, Киев, 03056, Украина;
тел/факс: 8 (044) 24 168 84;
e-mail: kuzminskiy@ibt.ntu-kpi.kiev.ua; ecobio@i.com.ua,
<http://www.ntu-kpi.kiev.ua/keb>

БИОТОПЛИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ – ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ.

I. ФЕРМЕНТНЫЕ ТОПЛИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ

Реферат

В обзорной работе осуществлен анализ состояния, рассмотрены проблемы и определены перспективы развития биотопливных элементов—электрохимических приспособлений, в которых с помощью микроорганизмов происходит прямое превращение химической энергии разнообразных веществ (углеводов, жиров, белков и др.) в электрическую в результате биохимических трансформаций.

К л ю ч е в ы е с л о в а: ферментные топливные элементы, прокариоты, эукариоты, медиаторы, анод, катод.

E.V. Kuzminskiy, P.I. Gvozdyak, N.B. Golub

National Technical University of Ukraine “KPI”, Pr. Peremogy, 37, block 4, office 182,
Kyiv, 03056, Ukraine, tel.: 8 (044) 24 168 84, e-mail: kuzminskiy@ibt.ntu-kpi.kiev.ua;
ecobio@i.com.ua, <http://www.ntu-kpi.kiev.ua/keb>

BIOFUEL CELLS — THE PROBLEMS AND PERSPECTIVES OF DEVELOPMENT. I. ENZYME FUEL CELLS

Summary

In this review the state of biofuel cells the problems concerning their development have been analyzed and determined. Biofuel cells are the electrochemical devices in which by the help of microorganisms the direct transformation of chemical energy of diggerent substances (carbohydrates, fats, proteins etc.) into electrical energy occurs as the result of biochemical transgormations.

Key words: enzyme fuel cells, prokaryotes, eukaryotes, mediators, anode, cathode.



УДК 579.25+575.11.113+577.152.1

Л.А. Жуковская¹, Р.В. Михайлова¹, Т.В. Семашко¹, А.Г. Лобанок¹,
Д.Г. Ярмолинский², Н.А. Картель²

¹ Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Купревича, 2, Минск, 220141,
Беларусь, тел. +375(17)267-62-09, e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, Минск,
220072, Беларусь, тел. +375(17)294-91-80, e-mail: D.Yarmolinsky@igc.bas-net.by

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ В *PENICILLIUM ADAMETZII* ЛФ F-2044.1

Для клонирования гена gox в P. adametzii ЛФ F-2044.1 сконструирован вектор pNOM102-GOX и отработаны условия получения протопластов гриба. Проведена электропорация P. adametzii ЛФ F-2044.1 и отобраны трансформанты, устойчивые к антибиотику генетицин. Штаммы P. adametzii ЛФ F-2044.1.17 и P. adametzii ЛФ F-2044.1.18 обладали повышенным уровнем синтеза глюкозооксидазы по продуцирующей способности мицелия в 2-2,5 раз. Установлено, что для сохранения векторов в составе трансформантов необходимо их поддержание на среде, содержащей антибиотик.

Ключевые слова: Penicillium adametzii, глюкозооксидаза, трансформация, ген gox.

Глюкозооксидаза (ГО) (β -D-глюкозо: O₂-1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4.) — фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление β -D-глюкозы до β -D-глюконолактона и пероксида водорода. Фермент широко используется в пищевой промышленности в качестве антиоксиданта и консерванта [1], в медицине — в качестве диагностического и терапевтического средства [3]. В химической промышленности фермент применяется для получения гидрохинона, глюконовой кислоты и ее солей [13].

До недавнего времени для усовершенствования промышленных штаммов — продуцентов ферментов использовались методы индуцированного мутагенеза и селекции. Эти методы применяются и теперь, но, наряду с ними, все большее распространение получают методы генетической инженерии, позволяющие создавать функционально активные генетические структуры *in vitro* из фрагментов геномов различных организмов, вводить рекомбинантные или гибридные молекулы в клетку и получать новые высокопродуктивные штаммы микроорганизмов.

В лаборатории ферментов ГНУ “Институт микробиологии НАН Беларуси” отобран *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 — активный продуцент ГО, характеризующий-

© Л.А. Жуковская, Р.В. Михайлова, Т.В. Семашко, А.Г. Лобанок, Д.Г. Ярмолинский, Н.А. Картель, 2008



ся морфологической и биохимической стабильностью [6]. Из ДНК данного гриба выделен и охарактеризован ген *gox*, кодирующий ГО [4].

Цель работы — провести молекулярное клонирование гена *gox* в *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 и получить рекомбинантные штаммы — продуценты ГО.

Материалы и методы

Для выполнения исследований использовали: *Escherichia coli* DH5 α (генотип supE44 delta lacU169 / phi80 lacZ delta M15/ hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1); плазмиды pUC19, pBluescript II KS (+), p35S-NptII из коллекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси, pNOM102, любезно предоставленную доктором P. Punt (Wageningen Center for Food Sciences (WCFS), Wageningen, The Netherlands), а также ген *gox* *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.

В качестве объектов исследования использовали *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 и полученные трансформанты гриба.

Геномную ДНК *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 выделяли по методу Punekar с соавт. [12].

Аmplификацию гена *gox* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с помощью праймеров STAGTCATATGATGGTGTCTGTA-TTTCTCAGC и TCAGAGAATTCCSTAGGCACCTTTTGGCATAGTC, синтезированных в ОДО “Прайм-тех” (Беларусь).

Ген *gox* *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 встраивали в плазмиду pNOM102 под контроль промотора глицеральдегидфосфатдегидрогеназы *A. nidulans* и терминатора гена индолглицеролфосфатсинтазы *A. nidulans*.

Клонирование амплифицированных генов *gox*, их рестрикционный анализ, трансформацию в *E. coli* DH5 α и электрофорез в агарозном геле проводили согласно стандартным методам [5].

В качестве селективного агента для *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 применяли генетицин (0,1-0,3 мг/мл).

Протопласты *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 получали ферментативным методом с использованием литических ферментов *Trichoderma harzianum* (“Sigma”, США) (100 мг препарата/1 г мицелия). К суспензии протопластов ($5 \cdot 10^5$) добавляли 16 мкг селективной плазмиды и 16 мкг экспрессионной плазмиды. Электропорацию проводили на приборе “CellJectPro” (“Thermo Electron Corporation”, США) в 10 мм кювете при напряжении 1,1 кВ, сопротивлении 1,54 кОм, электрической емкости 25 мкФ. Для регенерации протопласты инкубировали в жидкой питательной среде в течение 2 ч при температуре 26°C и высевали на чашки с сусло-агаром и селективным агентом. Трансформанты отбирались в два этапа: 1) по устойчивости к селективному агенту, 2) по результатам ПЦР-анализа.

Для обнаружения вставок вектора pNOM102-GOX в трансформированных штаммах *P. adametzii* использовали праймеры gpdA-F (CGCAGACCGGGAACA-CAAGC) и GODPa-R (CCAGTCAAACCACCACCAGCA). Продукты амплификации разделяли в 1 % агарозном геле в присутствии этидиумбромиды. О положительной амплификации судили по появлению фрагмента длиной 553 п. о.

Анализ вставок вектора p35S-NptII проводили при помощи амплификации с праймерами NptII-F-F (CATGATATCATGATTGAACAAGATGGA) и NptII-F-R (TTAGATATCTCAGAGAАCT-CGTCAAG). В присутствии вставок этого гена наблюдалась амплификация фрагмента длиной 813 п. о.



Способность к образованию внеклеточной ГО трансформантов *P. adametzii* оценивали после их глубинного культивирования на питательной среде Билай с 6 % глюкозы в качестве источника углерода [2].

Культивирование трансформантов проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на качалке (180 об/мин) при температуре 24-26°C в течение 96 часов. Плотность посева – $0,97-1,5 \cdot 10^6$ спор/мл. Подсчет спор проводили в камере Горяева [7].

Активность внеклеточной ГО определяли спектрофотометрическим методом в модификации Magkwell с соавт. [10], и выражали в ед/мл культуральной жидкости, ед/мг биомассы (продуцирующая способность мицелия).

Редуцирующие вещества (РВ) измеряли, используя 3,5-динитросалициловую кислоту [11]. Белок анализировали по методу Bradford [8], рН – потенциметрически.

Анализ генетической стабильности рекомбинантных штаммов осуществляли на протяжении 6 мес.

Приведенные результаты представляют собой усредненные величины 3-5 опытов, выполненных в трех повторностях.

Результаты исследований обрабатывали статистически, о достоверности различий судили при $P=0,05$.

Результаты и их обсуждение

Для встраивания гена *gox* *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 в плазмиду pNOM102 вводили полилинкер, несущий ряд дополнительных сайтов рестрикции. В буфер, содержащий 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА добавляли 100 пмоль олигонуклеотидов Linker NcoI-BamHI – F (CATGGATATCG-GTACCG) и Linker NcoI-BamHI – R (GATCCGGTACCGATATC). Смесь прогревали при 95°C 5 мин на водяной бане и медленно охлаждали до комнатной температуры. ДНК переосаждали спиртом и использовали для лигирования с плазмидой pNOM102, линейризованной ферментами NcoI и BamHI. Сконструированная плазида обозначена pNOM102-GOX (рис. 1а).

Известно, что векторы, используемые для трансформации, должны иметь генетические маркеры [9]. В связи со сложностью репликации крупных плазмид для трансформации мицелиальных грибов обычно используют 2 вектора: экспрессионный и селективный. При котрансформации частота штаммов, несущих неселективный вектор составляет от 30 до 90 %.

С целью подбора селективного агента *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 был проверен на устойчивость к гигромицину, глифосату и генетицину. Установлено, что *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 чувствителен к указанным соединениям в концентрациях 1,0 мг/мл (гигромицин), 0,25 мг/мл (генетицин), 15,0 мг/мл (глифосат).

Так как чувствительность к генетицину проявлялась в наименьшей концентрации, то данный антибиотик применяли в качестве селективного агента при отборе трансформантов. В опытах использовался вектор p35S-NptII, несущий кассету, состоящую из 35S промотора вируса цветной мозаики капусты, гена неомифосфотрансферазы II (NptII) и терминатора 35S (рис. 1б), взятого из набора реактивов pGreen [14] и придающего трансформантам устойчивость к генетицину. Для прямой трансформации вектор линейризован EcoRV.



Изучена зависимость образования протопластов от возраста мицелия гриба, инкубационной среды и количества осмотического стабилизатора. *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 выращивали глубинно в течение 24, 36 и 48 часов в жидкой среде, содержащей в качестве источника углерода 1 % глюкозы. По окончании культивирования мицелий отделяли центрифугированием (5 тыс. об/мин, 10 мин), промывали и ресуспендировали в 0,1 М фосфатном буфере с осмотическим стабилизатором, содержащим препарат литических ферментов. Инкубацию проводили в течение 1 - 4 часов при 26 °С в термостате. Лучшие результаты получены при 4-х часовой обработке суточного мицелия литическими ферментами.

При анализе влияния рН на выход протопластов показано, что обработка мицелия гриба ферментами при рН 5,5 (0,1М фосфатный буфер) была неэффективной, протопласты в реакционной среде отсутствовали. Частичный лизис клеточных стенок под действием литических ферментов отмечен при рН буфера 6,5 (выход протопластов составил $2 \cdot 10^4$ на 1 мл), а максимальный выход протопластов ($2 \cdot 10^5 \cdot 8 \cdot 10^5$ на 1 мл) получен при проведении ферментативной обработки грибного мицелия при рН 6,0.

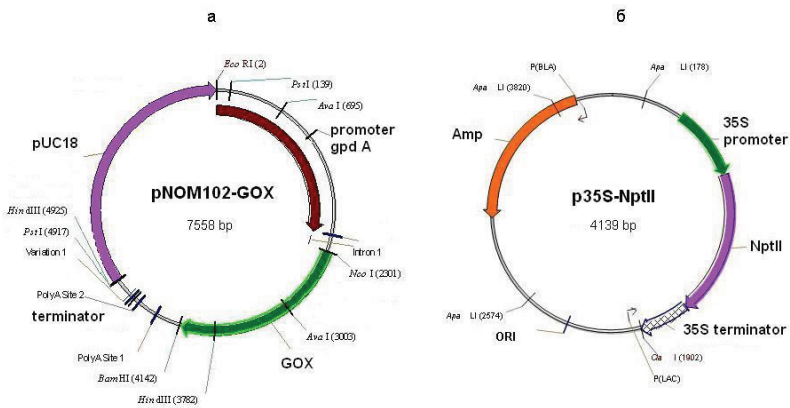


Рис. 1. Карты векторов:

а — экспрессионный вектор pNOM102-GOX; б — селективный вектор p35S-NptII

Fig. 1. Maps of vectors:

а — expression vector pNOM102-GOX; б — selective vector p35S-NptII

В качестве осмотического стабилизатора в работе использовали KCl (0,4-1,0 М). Применение 0,9 М KCl в реакционной смеси оказалось оптимальным для получения протопластов.

Таким образом, установлено, что максимальный выход протопластов *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 обеспечивается обработкой 24-часового мицелия гриба литическими ферментами *T. harzianum* при 25°С в течение 2 - 4 часов в фосфатном буфере (рН 6,0), содержащем 0,9 М KCl в качестве осмотического стабилизатора.

Для получения трансформантов протопласты гриба отделяли от мицелия и клеточных остатков, отмывали в STC-буфере. К суспензии протопластов добавляли селективный и экспрессионный векторы и проводили электропорацию.

Отобрано 36 трансформантов *P. adametzii*, устойчивых к генетицину. При помощи ПЦР установлено, что из них 19 штаммов содержали вектор pNOM102-

GOX, несущий ген *gox P. adametzii* ЛФ F-2044.1, и вектор p35S-NptII, несущий ген устойчивости к антибиотику генетицин, а 17 штаммов — только вектор p35S-NptII.

Проведенный анализ полученных трансформантов при их глубинном культивировании показал, что штаммы, несущие только вектор p35S-NptII, практически не отличались от исходной культуры по характеристикам (изменении активной кислотности среды, накоплении биомассы и белка, потреблении глюкозы, уровню синтеза внеклеточной ГО), изучаемых процессов. Это позволяет сделать вывод, что придание *P. adametzii* устойчивости к генетицину не оказывает влияния на рост трансформантов и продукцию фермента.

Штаммы, несущие оба трансформированных гена обладали повышенным уровнем синтеза ГО на 109,51-186,79 % (таблица).

Таблица

Биосинтез ГО рекомбинантными штаммами *P. adametzii*, содержащими векторы pNOM 102-GOX и p35S-NptII

Table

Biosynthesis go recombinant strains *P. Adametzii* contained the vectors pNOM 102-GOX and p35S-NptII

Штаммы <i>P. adametzii</i> ЛФ F-2044.1.	рН	Биомасса, мг/мл	Белок, мкг/мл	РВ, мг/мл	ГО			
					ед/мл	%	ед/мг	%
4	3,2	7,62±0,23	57,20±1,72	3,28±0,10	5,64±0,17	109,51	0,74±0,022	129,82
5	3,2	7,38±0,22	57,64±1,73	3,21±0,10	5,76±0,17	111,84	0,76±0,023	133,33
8	3,1	7,53±0,23	57,75±1,73	3,30±0,10	5,65±0,17	109,71	0,75±0,023	131,58
9	3,1	7,33±0,22	58,00±1,74	3,11±0,10	5,86±0,18	113,79	0,80±0,024	140,35
13	3,1	7,60±0,23	58,40±1,75	3,00±0,09	5,93±0,18	115,15	0,78±0,023	136,84
14	3,2	7,50±0,23	62,00±1,86	2,84±0,09	6,00±0,18	116,50	0,79±0,023	138,60
15	3,1	7,81±0,23	63,56±1,91	2,60±0,08	6,25±0,19	121,44	0,80±0,024	140,50
16	3,2	7,64±0,23	62,89±1,89	2,65±0,08	6,11±0,18	118,64	0,80±0,024	140,35
17	3,1	6,63±0,20	110,90±3,33	1,84±0,06	9,62±0,29	186,79	1,45±0,043	255,00
18	3,1	6,79±0,20	94,50±2,84	2,28±0,07	7,94±0,24	154,20	1,17±0,035	206,00
19	3,2	7,80±0,23	63,12±1,89	2,63±0,08	6,20±0,17	120,39	0,80±0,024	140,35
20	3,1	7,34±0,22	57,80±1,73	3,15±0,09	5,80±0,17	112,62	0,79±0,023	138,60
21	3,0	7,56±0,23	58,53±1,76	3,00±0,09	5,97±0,18	115,92	0,79±0,023	138,60
23	3,2	7,76±0,23	62,70±1,88	2,88±0,09	6,05±0,18	117,48	0,78±0,023	136,84
28	3,1	7,88±0,24	63,30±1,90	2,63±0,08	6,15±0,18	119,42	0,78±0,023	136,84
29	3,1	7,82±0,23	58,00±1,74	3,23±0,10	5,79±0,17	112,43	0,74±0,022	129,82
30	3,2	8,05±0,24	63,12±1,89	2,65±0,08	6,12±0,18	118,83	0,76±0,023	133,33
33	3,1	7,69±0,23	62,34±1,87	2,84±0,09	6,00±0,18	116,50	0,78±0,023	136,84
36	3,1	7,81±0,23	58,21±1,75	3,21±0,10	5,86±0,18	113,79	0,75±0,023	131,58
контроль	3,1	9,04±0,27	56,40±1,69	3,54±0,11	5,15±0,15	100,00	0,57±0,017	100,00

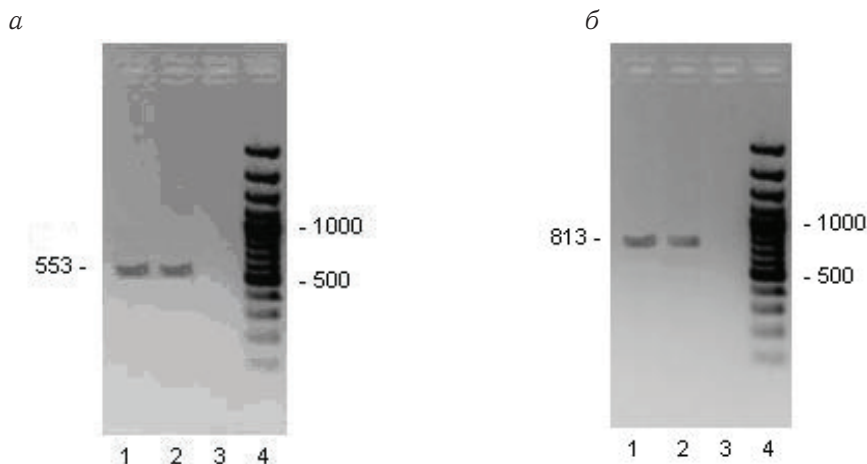


Ферментации этих штаммов проходили при изменении pH с 5,0 до 3,0-3,2. Грибы накапливали 6,63 - 8,05 мг биомассы в мл: минимальным этот показатель был у *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17, а максимальным — у *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.30.

P. adametzii ЛФ F-2044.1.4, *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.8, *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.29 медленнее других штаммов потребляли глюкозу (3,23-3,3 мг/мл). Для них характерен также более низкий уровень синтеза ГО (5,64-5,79 ед/мл).

Интенсивное потребление источника углерода характерно для трансформантов *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.15, ЛФ F-2044.1.16, ЛФ F-2044.1.17, ЛФ F-2044.1.18, ЛФ F-2044.1.28 (остаточный сахар — 1,84 - 2,65 мг/мл). Что касается внеклеточного белка, то, установлено, что по окончании культивирования его количество составило 57,2 - 110,9 мкг/мл и коррелировало с уровнем синтеза внеклеточной ГО данными штаммами. Наилучшие результаты по уровню синтеза ГО (154,2 - 186,8 %) и продуцирующей способности мицелия (206 - 255 %) получены у *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17, *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18 по сравнению с исходной культурой.

P. adametzii ЛФ F-2044.1.17 и *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18 отобраны для дальнейших исследований, как штаммы, обладающие более высоким уровнем синтеза внеклеточной ГО и содержащие оба трансформированных вектора (рис. 2).



P. adametzii ЛФ F-2044.1.17, 2- *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18, 3- контроль *P. adametzii* ЛФ F-2044.1, 4- маркер (GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas))

Рис. 2. ПЦР-анализ наличия векторов pNOM102-GOX (а) и p35S-NptII (б) у трансформантов *P. adametzii*

Fig. 2. PCR-analysis of presence of vectors pNOM102-GOX (a) and p35S-NptII (б) in *P. adametzii* transformants

Изучено влияние условий поддержания *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 и *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18 на способность синтезировать внеклеточную ГО. По результатам ПЦР анализа данных штаммов, поддерживаемых в течение 6 мес в неселективных и селективных условиях, установлено, что в первом случае происходит утрата трансформированного гена (рис. 3). Следовательно, для сохранения трансформированных генов в рекомбинантных штаммах *P. adametzii* необходимо поддержание культур на средах, содержащих селективный агент.

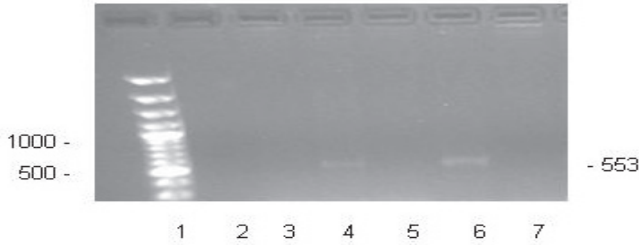


Рис. 3. ПЦР-анализ ДНК рекомбинантных штаммов *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 и *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18, поддерживаемых в течение 6 мес в селективных и неселективных условиях

Fig. 3. PCR-analysis of DNA of recombinant *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 and *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18 strains maintained during 6 months in selective and nonselective conditions

1 – маркер (GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas)), 2 – контроль (исходный штамм *P. adametzii* ЛФ F-2044.1), 3 – *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17, хранимый в неселективных условиях, 4 – *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17, хранимый в селективных условиях, 5 – *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18, хранимый в неселективных условиях, 6 – *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18, хранимый в селективных условиях, 7 – отрицательный контроль ПЦР

Таким образом, в результате выполненных исследований сконструирован вектор pNOM102-GOX, отработаны условия получения протопластов *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 и проведена трансформация гриба. По устойчивости к генетицину и наличию трансформированных генов отобраны трансформанты *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 и *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18, обладающие повышенным уровнем синтеза ГО по продуцирующей способности мицелия в 2-2,5 раз.

Авторы выражают благодарность доктору P. Punt (Wageningen Center for Food Sciences (WCFS), Wageningen, The Netherlands) за предоставленную плазмиду pNOM102.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андеркофлер Л. М. Производство и применение ферментных препаратов в пищевой промышленности. / Под ред. Р. В. Фениксовой. – М.: Пищепромиздат, 1963. – С. 73–88.
2. Билай В. И. Основы общей микологии // Киев: Вища школа, 1974. – 396 с.
3. Билай В. И., Пидопличко И. М., Артемчук Н. Я. Белки в медицине и народном хозяйстве. / Отв. ред. М. Ф. Гулый. – Киев: Наук думка, 1965. – С. 124–131.
4. Жуковская Л. А., Ярмолинский Д. Г., Михайлова Р. В., Семашко Т. В., Картель Н. А., Лобанок А. Г. Секвенирование и характеристика гена глюкозооксидазы *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044.1 // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. – 2008. – № 1. – С. 69-73.
5. Маниатис Т., Фрич Э. Молекулярное клонирование // М.: Мир, 1984. – 479 с.

6. Михайлова Р. В., Жуковская Л. А., Лобанок А. Г. Изучение спонтанной изменчивости *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044 — продуцента глюкозооксидазы // Прикл. биохимия и микробиология. — 2007. — Т.43. — № 2. — С. 207-211.
7. Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. // М.: МГУ, 1971. — С. 142-146.
8. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Annal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
9. Diez R. B. Strategies for the transformation of filamentous fungi // Journal of Applied Microbiology. — 2002. — Vol. 92. — P. 189-195.
10. Markwell I., Frakes L. G., Brott E. C., Osterman I, Wagner F. W. *Aspergillus niger* mutants with increased glucose oxidase production // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1989. — Vol. 30. — № 2. — P. 166–169.
11. Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Anal. Chem. — 1959. — Vol. 31. — P. 426–428.
12. Punekar N. S. et al Isolation of genomic DNA from acetone-dried *Aspergillus* mycelia // Fungal Genet. Newsl. — 2003. — Vol. 50. — P. 15-16.
13. Roehr M., Kubicek Ch. P., Kominek I. Gluconic acid // In Rehm H. S., Reed G., editors. Biotechnology. — 1996. — Vol. 6. — P. 347-362.
14. Roger H. P. et al pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation // Plant Mol. Bio. — 2000. — Vol. 42. — P. 819-832.



Л. О. Жуковська, Р. В. Міхайлова¹, Т. В. Семашко¹, А. Г. Лобанок¹, Д. Г. Ярмо-
лінський², Н. А. Картель²

¹Інститут мікробіології НАН Білорусі, вул. Купрєвіча, 2, Мінськ, 220141, Білорусь,
тел.: +375(17)267-62-09, e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by

²Інститут генетики і цитології НАН Білорусі, вул. Академічна, 27,
Мінськ, 220072, Білорусь, тел.: +375(17)294-91-80,
e-mail: D.Yarmolinsky@igc.bas-net.by

КЛОНУВАННЯ ГЕНА ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ В *PENICILLIUM ADAMETZII* ЛФ F-2044.1

Реферат

Для клонування гена *gox* в *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 сконструйовано вектор pNOM102-GOX і відпрацьовані умови отримання протопластів гриба. Проведена електропорація *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 і відібрані трансформанти, стійкі до антибіотику генетицину. Штами *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 і *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18 мали підвищений рівень синтезу глюकोзооксидази по продуктивній здатності міцелію в 2-2,5 рази. Встановлено, що для зберігання векторів в складі трансформантів необхідно їх підтримання на середовищі, що містить антибіотик генетицин.

К л ю ч о в і с л о в а : *Penicillium adametzii*, глюкозооксидаза, трансфор-
мація, ген *gox*

L. A. Zhukouskaya¹, R. V. Mikhailova¹, T. V. Semashko¹, A. G. Lobanok¹,
D. G. Yarmolinsky², N. A. Kartel²

¹Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences, Kuprevich str., 2,
Minsk, 220141, Belarus, tel.: +375(17)267-62-09, e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by

²Institute of genetic and cytology, Belarus National Academy of Sciences,
Academycheskaya str., 27, Minsk, 220072, Belarus, tel. +375(17)294-91-80,
e-mail: D.Yarmolinsky@igc.bas-net.by

KLONING OF GLUCOSE OXIDASE GENE IN *PENICILLIUM ADAMETZII* LF F-2044.1

Summary

Vector pNOM102-GOX was engineered to cloning gene *gox* in *P. adametzii* LF F-2044.1 and conditions were optimized for production of fungal protoplasts. Electroporation of *P. adametzii* LF F-2044.1 was conducted and transformants resistant to antibiotic geneticin were selected. Strains *P. adametzii* LF F-2044.1.17 and *P. adametzii* LF F-2044.1.18 displayed increased levels of glucose oxidase synthesis — mycelium productivity rose 2 - 2.5 times. It was found that efficient preservation of vectors in the transformants requires maintenance on the media containing antibiotic geneticin.

К e y w o r d s : *Penicillium adametzii*, glucose oxidase, transformation, gene *gox*



**І.О. Малярчик, Т.О. Філіпова, Б.М. Галкін, Л.М. Вострова,
М.В. Гренадьорова**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (048) 63 57 61,
e-mail: igormal85@mail.ru

АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ N-БЕНЗОТІАЗОЛ-2-ІЛ-БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМІДУ І ЙОГО АНАЛОГІВ З НУКЛЕОФІЛЬНИМИ ЗАМІСНИКАМИ

Встановлено, що N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід (сполука I) та його похідні з нуклеофільними замісниками (сполуки II, III і IV) дозо-залежно пригнічують in vitro ріст S. aureus, P. aeruginosa і S. enteritidis. Інгібувальний вплив на стафілокок не залежав від структури похідних. Водночас, аналоги з нуклеофільними замісниками були більш активними у порівнянні зі сполукою I щодо грамнегативних бактерій. У присутності пара-амінобензойної кислоти антимікробна дія сполуки I знижувалася приблизно на 40 %, а сполук III і IV майже не змінювалась.

К л ю ч о в і с л о в а: антимікробна активність, N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід, похідні з нуклеофільними замісниками, антагонізм з пара-амінобензойною кислотою.

До сульфаніламідних препаратів відноситься група лікарських антимікробних сполук, що є похідними сульфанілової кислоти, наприклад, білий стрептоцид, сульфазол, сульфідин, сульгін, дисульфан [3,4].

Хіміотерапевтична активність сульфаніламідних препаратів була виявлена на початку 30-х років ХХ століття. Це перша група сучасних хіміотерапевтичних антибактеріальних засобів. Із появою пеніциліну та інших антибіотиків застосування сульфаніламідів трохи скоротилося, однак, значення препарати цієї групи не втратили та успішно використовуються при інфекційних захворюваннях, викликаних чутливими до них мікроорганізмами [2,4]. Сульфаніламідні препарати володіють хіміотерапевтичною активністю при інфекціях, що спричинені грампозитивними та грамнегативними бактеріями, деякими найпростішими (збудники малярії, токсоплазмозу) [3,10].

Останнім часом з'явилися дані про антивірусні властивості нових аналогів сульфаніламідів. Зокрема, показано, що вони ефективно захищають in vitro культури клітин від зараження вірусом герпесу та ВІЛ. Встановлена здатність бісептолу суттєво знижувати смертність ВІЛ-інфікованих дітей за рахунок зменшення



кількості CD4 рецепторів на поверхні Т-хелперів, внаслідок чого блокується потрапляння вірусу усередину цих клітин [14]. На основі нових похідних сульфаніламідів отримані також сучасні протизапальні засоби, які вибірково пригнічують активність циклооксигенази 2 [8]. Виявлення нових видів активності у сульфаніламідів поновило інтерес до цієї групи антимікробних засобів. Сьогодні у світі численні лабораторії синтезують та вивчають властивості нових аналогів цих препаратів, що є свідченням актуальності цієї проблеми [6,12,13].

Виходячи з цього, метою даної роботи було вивчення профілю та особливостей антимікробної дії N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду та його похідних.

Матеріали і методи

У роботі як тест-мікроорганізми використовували колекційні штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 і *Salmonella enteritidis* var. Isatchenko ВНИИСХМ 18/1 отримані з колекції культур кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Зберігання тест-штамів проводили на поверхні скошеного м'ясо-пептонного агару (МПА) при температурі 4 °С. Для експерименту використовувались добові культури, що вирощувались у пробірках на скошеному МПА при 37 °С.

Вплив досліджуваних речовин оцінювали за накопиченням біомаси у контрольних та дослідних варіантах. У роботі використовували рідке середовище Гісса з глюкозою без індикатора Андреде, яке розливали в пробірки по 1 мл. Досліджувані сполуки додавали в пробірки до кінцевих концентрацій 0,4; 4; 40 та 80 мкМ. Пробірки з середовищем стерилізували в автоклаві при 0,5 атм. Всі експерименти проводили у 3 - 5 повторях. Кількість паралелей у кожному експерименті дорівнювала 5.

Добові культури тест-мікроорганізмів, вирощені на скошеному МПА в пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином, стандартизували суспензію за стандартом каламутності ГКІ № 9 і розводили стерильним фізіологічним розчином до концентрації $2 \cdot 10^4$ клітин/мл. З отриманого інокуляту відбирали по 50 мкл та вносили до кожної пробірки. Таким чином, кінцева концентрація клітин у 1 мл середовища дорівнювала $1 \cdot 10^3$. Культури з сульфаніламидами інкубували в термостаті при температурі 37 °С протягом 24 годин, після чого вимірювали оптичну густину культури на спектрофотометрі "Spekol-10" (Німеччина) при довжині хвилі 540 нм. Кількість накопиченої біомаси тест-штамів визначали за калібрувальними кривими, для побудови яких біомасу зразків з певною оптичною густиною відмивали від поживного середовища та висушували до постійної маси. Зважування зразків проводили на електронних вагах Adventurer (США). За контроль правили культури мікроорганізмів, паралельно вирощені в середовищі Гісса без додавання досліджуваних речовин.

При вивченні впливу *para*-амінобензойної кислоти (ПАБК) на антимікробну активність досліджуваних сполук останні використовували у кінцевій концентрації 40 мкМ. ПАБК додавали у проби до кінцевих концентрацій 0,4; 4 і 40 мкМ. Хід експерименту був аналогічний описаному вище. Як сполуку порівняння у цих дослідах використовували стрептоцид.

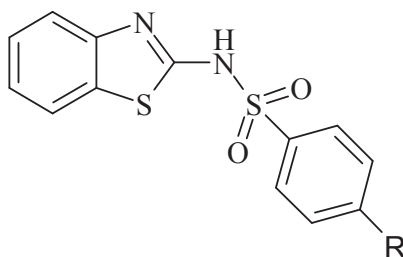
Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного та кореляційного аналізу. Розраховували середні значення показників (\bar{X}) та їх стандартну помилку ($S_{\bar{X}}$). Вірогідність від-



мінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Ст'юдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів за рівнем значимості не менше 95 % ($p \leq 0,05$). Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel.

Результати та їх обговорення

У роботі використовували сполуки, що були синтезовані у Проблемній науково-дослідній лабораторії № 5 Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. Базовою є сполука I, а інші є похідними, в яких у бензольному кільці атом водню заміщений на нуклеофільні замісники (R): H (I), Cl (II), F (III), NO₂ (IV).



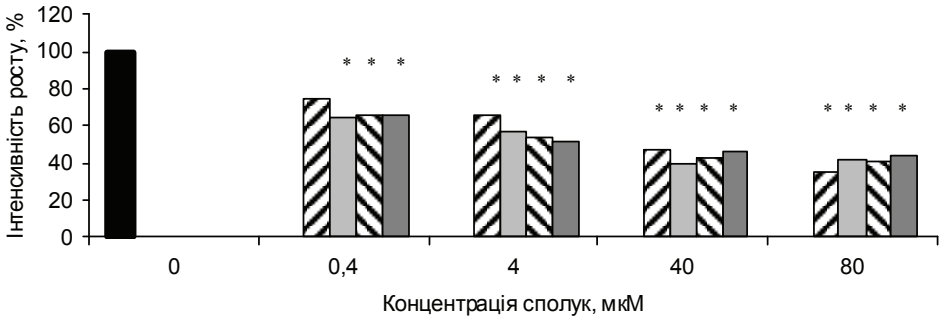
При вивченні дії нових аналогів сульфаніламідів використовували три штами бактерій — *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* і *Pseudomonas aeruginosa*, з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології і вірусології ОНУ. Дані мікроорганізми були взяті як представники грам-позитивних та грам-негативних бактерій. Для вивчення антимікробного ефекту сполук, використовували концентрації 0,4; 4; 40 та 80 мкМ у рідкому середовищі.

Отримані результати (рис. 1) свідчать, що усі досліджувані сполуки здатні інгібувати ріст тест-мікроорганізмів. Для *S. aureus* було виявлено залежне від концентрації інгібування росту усіма дослідженими сполуками. Сполука I пригнічувала ріст стафілококу на 25 % у концентрації 0,4 мкМ та на 65 % у концентрації 80 мкМ. Для сполук II, III, IV не спостерігалось значних відмінностей у величині антимікробної дії порівняно зі сполукою I (рис. 1А). Таким чином, можна зробити висновок, що присутність нуклеофільних замісників практично не впливає на величину антимікробного ефекту вивчених бензотіазолів щодо *S. aureus*.

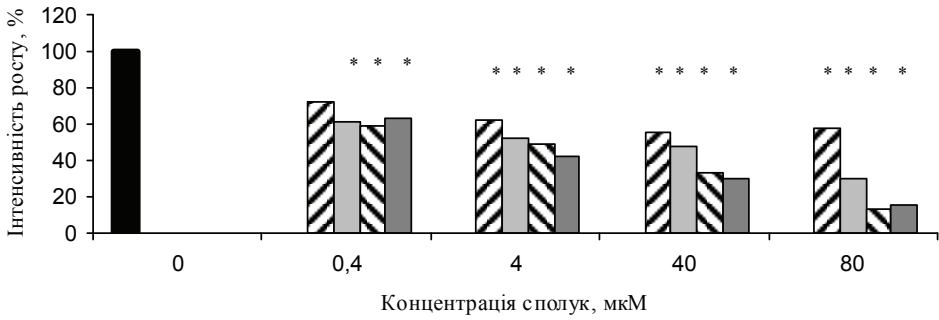
Для грамнегативних бактерій спостерігалася інша картина (рис. 1Б і 1В). У цих випадках, особливо при високих концентраціях, виявлено більш високу антимікробну дію похідних з нуклеофільними замісниками. Так, інгібування росту *P. aeruginosa* сполукою I у концентрації 80 мкМ становило 52 %, а ефекти похідних з нуклеофільними замісниками при цій самій концентрації дорівнювали 70 % (сполука II), 86 % (сполука III) та 84 % (сполука IV). Для *S. enteritidis* встановлено таку саму закономірність, хоча її чутливість до досліджених похідних бензотіазолу була дещо нижчою, ніж чутливість псевдомонади. Більш висока активність галогенвісних сполук II і III може бути пов'язана з дією бактеріальних дегалогеназ, які відокремлюють від органічних сполук токсичні для клітин аніони галогенів [9,11]. Щодо сполуки IV підвищення її антимікробної активності може бути обумовлено відновленням нітрогрупи під дією нітратредуктази усередині бактеріальних клітин. Як відомо, у ході цього процесу з'являються метаболіти нітросполук і вільні радикали, які чинять бактерицидну дію [5].



A *Staphylococcus aureus*



Б *Pseudomonas aeruginosa*



В *Salmonella enteritidis*

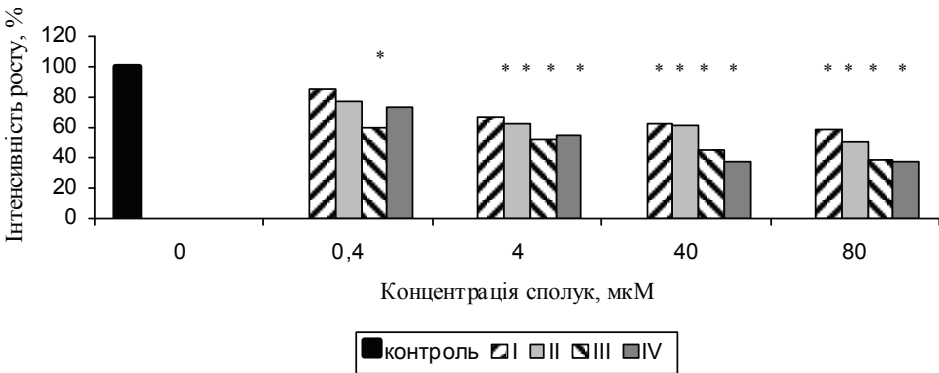


Рис. 1. Вплив похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів (I-IV) на ріст тест-штамів

* — різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Fig. 1. The influence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives (I-IV) on the test-strain growth

Механізм дії відомих сульфаніламідів пов'язаний, головним чином, із порушенням утворення мікроорганізмами необхідних для їх розвитку ростових факторів — фолієвої і дигідрофолієвої кислот та інших речовин, до молекули яких входить *para*-амінобензойна кислота [3,10]. Сульфаніаміди близькі за будовою молекул до ПАБК і використовуються мікробною клітиною замість останньої. При цьому відбувається конкурентне інгібування дигідроптероатсинтази.

Враховуючи існуючі літературні дані [1] про те, що ПАБК здатна відмінити дію сульфаніламідів, на наступному етапі роботи був вивчений її вплив на антимікробні ефекти *N*-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду та його похідних. Для цього тест-штами вирощувалися у рідкому середовищі 24 години за присутності 40 мкМ досліджуваних сполук та ПАБК у концентраціях 0,4, 4, та 40 мкМ.

Отримані результати (рис. 2) свідчать про те, що сполука I за присутності ПАБК втрачала свою активність по відношенню до усіх використаних тест-штамів у 2 - 2,5 рази. Цей ефект *para*-амінобензойної кислоти не залежав від її концентрації у середовищі. Якщо ПАБК додавалася до культур мікроорганізмів за відсутності похідних бензотіазолу, вона дещо підвищувала їх ріст у порівнянні з контролем: приблизно на 8-20 %.

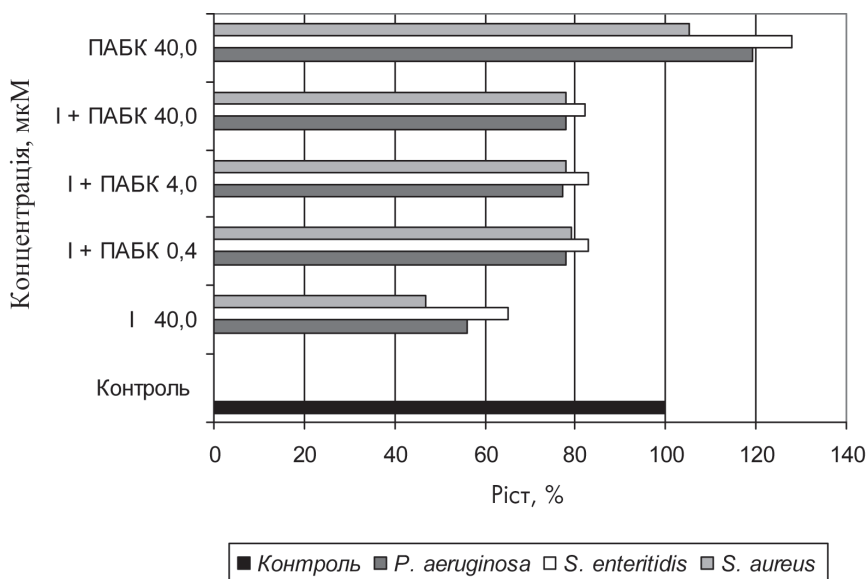


Рис. 2. Вплив різних концентрацій ПАБК на антимікробну активність сполуки I

Примітка (тут і на рис. 3 і 4): * — різниця вірогідна для усіх мікроорганізмів у порівнянні з контролем, ** — різниця вірогідна для усіх мікроорганізмів у порівнянні з ПАБА

Fig. 2. Influence of different PABA concentration on compound I antimicrobial activity

При додаванні ПАБК у середовище разом зі сполуками III і IV (рис. 3-4) її антагоністичний вплив практично не виявлявся. Ріст усіх тест-штамів підвищувався не більше ніж на 5 - 10 %



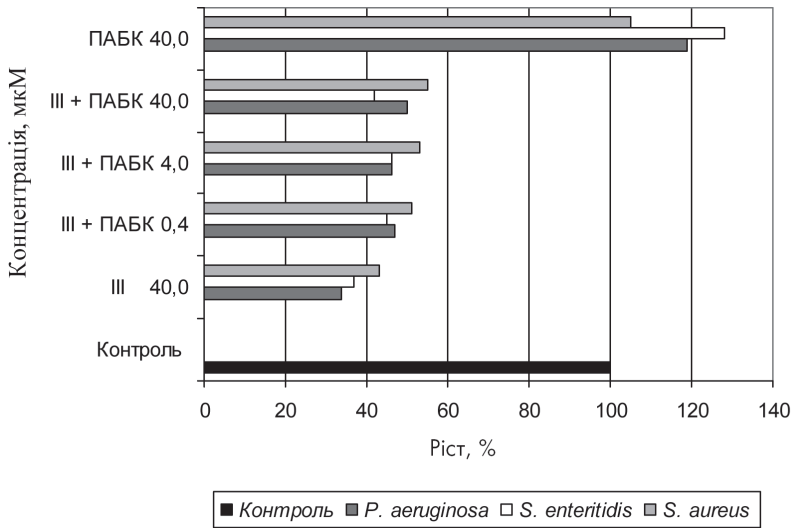


Рис. 3. Вплив різних концентрацій ПАБК на антимікробну активність сполуки III
 Fig. 3. Influence of different PABA concentration on compound III antimicrobial activity

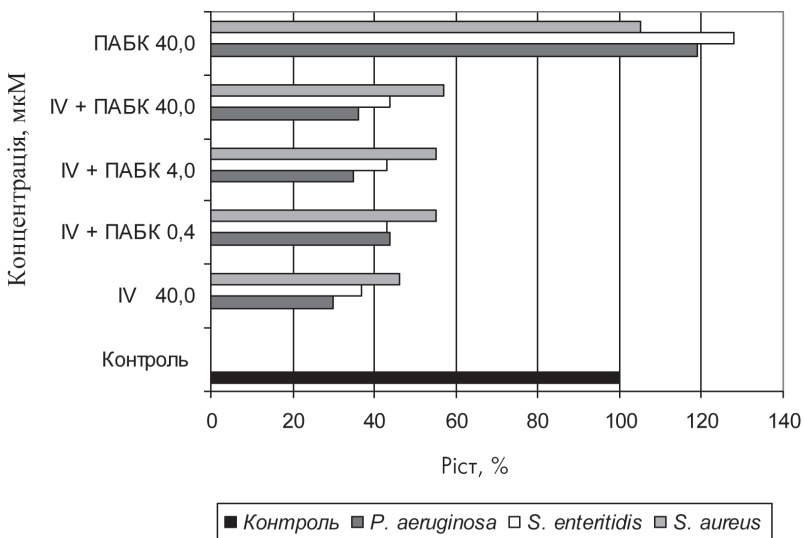


Рис. 4. Вплив різних концентрацій ПАБК на антимікробну активність сполуки IV
 Fig. 4. Influence of different PABA concentration on compound IV antimicrobial activity

На відміну від N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів та його похідних пара-амінобензойна кислота навіть у меншій концентрації відмінно діяла антимікробно щодо стрептоциду щодо *S. aureus* і *S. enteritidis* (табл.). Ріст *P. aeruginosa* стрептоцид не пригнічував зовсім. Крім того, за одночасної присутності стрептоциду і ПАБК спостерігалось деяке стимулювання росту усіх тест-штамів.

Вплив ПАБК на антимікробну дію стрептоциду (E_{540})

Table

PABA influence on antimicrobial activity of streptocide (E_{540})

Мікроорганізм	Контроль	Стрептоцид 40 мкМ	Стрептоцид + 0,4 мкМ ПАБК	Стрептоцид + 40,0 мкМ ПАБК
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,600 ± 0,06	0,430 ± 0,04*	0,620 ± 0,06	0,650 ± 0,06
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,505 ± 0,05	0,235 ± 0,02*	0,520 ± 0,05	0,595 ± 0,05*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,675 ± 0,07	0,655 ± 0,04	0,705 ± 0,07	0,710 ± 0,08

Примітка: * – різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Таким чином, отримані результати свідчать, що нові аналоги сульфаніламідів, N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід і його похідні з нуклеофільними замісниками, здатні суттєво пригнічувати ріст бактерій. За даними щодо взаємодії цих сполук з *para*-амінобензойною кислотою можна зробити висновок, що механізм їх антимікробної дії зв'язаний не тільки з інгібуванням дигідрофоліату синтази. Найбільше він притаманний сполуці I, оскільки ПАБК знижує її антимікробний ефект приблизно на 50 %. Щодо сполук з нуклеофільними замісниками, то вони, скоріше за все, не впливають на синтез фолієвої кислоти взагалі. Отже, можна вважати, що активність досліджуваних сполук обумовлюється іншим механізмом, або механізмами. За даними літератури відомо, що деякі нові похідні сульфаніламідів можуть запобігати спіралізації ДНК за рахунок інгібування ДНК-гірази або пригнічують фенілаланіл-tРНК-синтетазу бактеріальних клітин [6,7]. При цьому такі похідні майже не впливають на синтез фолієвої кислоти. Подальші дослідження похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів будуть спрямовані як на встановлення спектру їх антимікробної дії, так і визначення механізмів, що обумовлюють їх активність.

ЛІТЕРАТУРА

1. Альберт Э. Избирательная токсичность. — М.: Мир, 2001. — 468 с.
2. Гуртовой Б. А., Кулаков В. И, Воропаева С. Д. Применение антибиотиков в акушерстве и гинекологии. — М.: Русфармамед, 1996. — 140 с.
3. Падейская Е. Н. Комбинированные антибактериальные препараты на основе производных сульфаниламида и диаминопиримидина // Новые лекарственные препараты, сб. трудов ВНИХФИ. — 1991. — С. 94-104.
4. Сидоренко С. В. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. — М.: Наука, 2002. — 142 с.
5. Bedzyk L, Tao Wang, Rick W. Ye. The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification // J. Bacteriol. — 1999. — V. 181, № 9. — P. 2802-2806.
6. Bergan, T., Ortengren B., Westerlund D. Clinical pharmacokinetics of co-trimazine // Clin. Pharmacokinet. — 1986. — V. 11. — P. 372-386.
7. Beyer D., Kroll H.-P., Endermann R., Schiffer G., Siegel S., Bauser M., Pohlmann J., Brands M., Ziegelbauer K., Haebich D., Eymann Ch., Brötz-Oesterhelt H. New class of



- bacterial phenylalanyl-tRNA synthetase inhibitors with high potency and broad-spectrum activity // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – V. 48, □ 2. – P. 525-532.
8. *Chuang H.-Ch., Kardosh A., Gaffney K. J., Petasis N. A., Schönthal A. H.* COX-2 inhibition is neither necessary nor sufficient for celecoxib to suppress tumor cell proliferation and focus formation in vitro // <http://www.molecular-cancer.com/content/7/1/38> – 2008. – 16 May.
 9. *Fetzner S., Lingens F.* Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1994. – V. 58, 4. – P. 641-685.
 10. *Ives H. E.* Basic and clinical pharmacology // *Lange Basic Science* – New York, 2004. – P. 241-259.
 11. *de Jong R. M., Dijkstra B. W.* Structure and mechanism of bacterial dehalogenases: different ways to cleave a carbon-halogen bond // *Curr. Opin. Str. Biol.* – 2003. – V. 13, № 6. – P. 722-730.
 12. *Mengelers M. J., Hougee P. E., Janssen L. H., Van Miert A. S.* Structure-activity relationships between antibacterial activities and physicochemical properties of sulfonamides // *Vet. Pharmacol. Ther. J.* – 1997. – V. 20, № 4. – P. 276-283.
 13. *Richards R. M., Taylor R. B., Zhu Z. Y.* Mechanism for synergism between sulphonamides and trimethoprim clarified // *Pharm. Pharmacol. J.* – 1996. – V. 48, № 9. – P. 981-984.
 14. *Vermeire K., Thomas W., Heung-jin Choi, Qi Jin, Samala M. F., Andrej S., de Clercq E., Dominiqued S.* The anti-HIV potency of cyclotriazadisulfonamide analogs is directly correlated with their ability to down-modulate the CD4 receptor // *Molecular Pharmacology* – 2002. – V. 63. – P. 203-210.

**И. О. Малярчик, Т. О. Филиппова, Б. Н. Галкин, Л. Н. Вострова,
М. В. Гренадёрва**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (048) 63 57 61,
e-mail: igormal85@mail.ru

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА N-БЕНЗОТИАЗОЛ-2-ИЛ- БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМИДА И ЕГО АНАЛОГОВ С НУКЛЕОФИЛЬНЫМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ

Реферат

Показано, что N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамид (соединение I) и его производные с нуклеофильными заместителями (соединения II, III и IV) дозозависимо угнетают *in vitro* рост *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *S. enteritidis*. Ингибирующее влияние на стафилококк не зависело от структуры производных. В то же время, аналоги с нуклеофильными заместителями были более активными по сравнению с соединением I в отношении грамотрицательных бактерий. В присутствии пара-аминобензойной кислоты антимикробное действие соединения I снижалось приблизительно на 40 %, а соединений III и IV практически не изменялось.

К л ю ч е в ы е с л о в а: антимикробная активность, N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамид, производные с нуклеофильными заместителями, антагонизм с пара-аминобензойной кислотой.



**I. O. Malarchik, T. O. Filipova, B. M. Galkin, L. M. Vostrova,
M. V. Grenaderova**

Odesa Mechnykov National University
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: 8 (048) 63 57 61,
e-mail: igormal85@mail.ru

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF N-BENZOTIAZOL-2- YL-BENZENSULFONAMIDE AND THEIR ANALOGS WITH NUCLEOPHYLIC RADICALS

Summary

It was shown that N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide (compound I) and its derivatives with nucleophylic radicals (compounds II, III and IV) can inhibit *in vitro* *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *S. enteritidis* growth in depending on a dose. The inhibitory effect of these compounds on *S. aureus* did not depend on their structures. At the same time, the derivatives with nucleophylic radicals were more effective against gram-negative bacteria than compound I. In presence of para-aminobenzoic acid antimicrobial effect of the compound I decreased approximately by 40 %. For the compounds III and IV there were no any decreasing of antimicrobial activity detected in presence of PABA.

K e y w o r d s: antimicrobial activity, N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide, derivatives with nucleophylic radicals, antagonism with para-aminobenzoic acid.



А.А. Галушка, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна,
тел. 8 (032) 239 40 53, e-mail: a_halushka@mail.ru

ВПЛИВ СІРКОВОДНЮ НА *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Досліджено ріст Saccharomyces cerevisiae у середовищах з різними концентраціями сірководню. Сірководень концентрацією 9,4 мМ повністю пригнічує ріст дріжджів у аеробних та анаеробних умовах. На електронномікроскопічних фотографіях клітин, оброблених сірководнем, добре помітні зміни у клітинній стінці, цитоплазматичній мембрані та вакуолі. Оброблення клітин сірководнем в концентрації 31,3 мМ протягом 45 хв забезпечує 16 % виживання дріжджів. Виділені ауксотрофні мутанти з клітин, оброблених сірководнем.

К л ю ч о в і с л о в а: сірководень, Saccharomyces cerevisiae, токсичність, мутагенність, ультраструктура.

Гострою екологічною проблемою у західних регіонах України є нагромадження сірководню у водоймах, що утворилися на місці колишніх сірковидобувних кар'єрів. Сірководень виявляє високу токсичність для тварин та людей, включаючи порушення функціонування різних органів та систем [9]. Хронічна інтоксикація сірководнем небезпечна для здоров'я людини навіть за таких концентрацій, коли його запах не відчутний.

Сірководень виявляє генотоксичну [4] та канцерогенну [8] дію. Він пригнічує люмінесценцію у *Vibrio fischeri* [12], пригнічує ріст археобактерій [13] та ціанобактерій [6, 14]. Вважають, що механізм дії сірководню полягає у пошкодженні метало- та дисульфідвмісних білків [9], він викликає деполяризацію мітохондріальних мембран у морських безхребетних [10]. Багато аспектів дії сірководню залишаються нез'ясованими.

Мікроорганізми є зручними об'єктами для вивчення механізму дії різних сполук. В цій роботі представлені результати вивчення впливу сірководню на факультативно анаеробні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були дріжджі *S. cerevisiae*. Дріжджі вирощували у середовищі Беркгольдера [5] при температурі 30 °С.

Біомасу вимірювали турбідиметрично за допомогою КФК-3 при довжині хвилі 540 нм. Концентрацію сірководню у культуральній рідині визначали турбідиметрично [7] на КФК-3. Клітини відділяли центрифугуванням при 5 тис. об/хв протягом



15 хв. Для визначення кількості сірководню, що випаровується в процесі роботи, ставили контрольний дослід без клітин.

Для визначення мутагенної дії сірководню на дріжджі використовували штамп *S. cerevisiae* ВКМ У-416 D-67-S. Вживання дріжджів під впливом сірководню визначали в середовищі, що містило 1,56; 31,3 і 156 мМ сірководню. Обробіток клітин сірководнем проводили протягом 0, 5, 15, 25, 35 і 45 хв. Використовували однодобову культуру дріжджів, вирощених у середовищі ҀЕРD такого складу: 1 % дріжджового екстракту, 2 % пептону, 2 % глюкози. До суспензії клітин додавали натрій сульфід і після відповідного періоду інкубації, двічі відмивали стерильною водопровідною водою, осаджували при 3000 об/хв протягом 10 хв і ресуспендували в 3 мл стерильної водопровідної води. Суспензію використовували для посіву на чашки Петрі з агаризованим середовищем Беркгольдера, що містило дріжджовий екстракт (500 мг/л) і 1 % глюкозу (максимальне середовище). Мінімальне середовище містило глюкозу, біотин та тіамін. Біотин додавали у концентрації 5 мкг/л, тіамін — 400 мкг/л. Чашки поміщали в термостат на 3 доби при 30 °С. Контролем служила кількість колоній дріжджів, що вирости на цьому ж середовищі, засіяному не обробленими сірководнем клітинами.

Для виділення ауксотрофних мутантів дріжджів колонії, що вирости на максимальному середовищі, переносили на мінімальне середовище, використовуючи метод відбитків [2]. Колонії, що не вирости на мінімальному середовищі, відсівали у пробірки з трьома мілілітрами мінімального чи максимального середовища. Колонії, що не росли у мінімальному середовищі, вважали мутантними.

Зміни в структурі клітин вивчали за допомогою електронної мікроскопії. Для цього двічі відмиті стерильною водопровідною водою клітини осаджували центрифугуванням при 10 тис. об/хв протягом 15 хв. Клітини фіксували в 1,5 % розчині калій перманганату. Фіксовані клітини обезводнювали у розчинах із зростаючими концентраціями етанолу і пропілен оксиду та переносили в епоксидну смолу Ероп 812. Ультратонкі зрізи клітин отримували на ультрамікромомі УМТП–6 і контрастували плюмбум цитратом за Рейнольдсом [16]. Перегляд і фотографування зразків проводили на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 при прискорюючій напрузі 75 кВ.

Статистичне оброблення отриманих результатів проводили з використанням програми “Origin 6.1”. Вибір тактики статистичного оброблення і підготовку даних для аналізу здійснювали, базуючись на загальноприйнятих методах [1] при рівні достовірності $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Одним із механізмів негативного впливу сірководню на живі організми є взаємодія з метало- та дисульфідвмісними ферментами [9]. Деякі автори вважають, що токсичність сірководню в першу чергу пов'язана з інгібуванням цитохромоксидази — ключового ферменту дихального ланцюга [11]. Тому доцільно було дослідити ріст дріжджів в присутності сірководню за аеробних та анаеробних умов. Дріжджі *S. cerevisiae* є зручним об'єктом для таких досліджень, оскільки вони, як відомо, є факультативними анаеробами. Для визначення впливу сірководню на ріст дріжджів їх вирощували у 50 мл колбах, закритих ватно-марлевими корками, із 15 мл середовища без перемішування (аеробні умови). Для створення анаеробних умов пробірки повністю заповнювали середовищем та закривали гумовими корками.



За аеробних умов вже при концентрації сірководню 1,56 мМ рівень нагромадження біомаси був нижчим, ніж у контрольному варіанті (рис. 1, а, б).

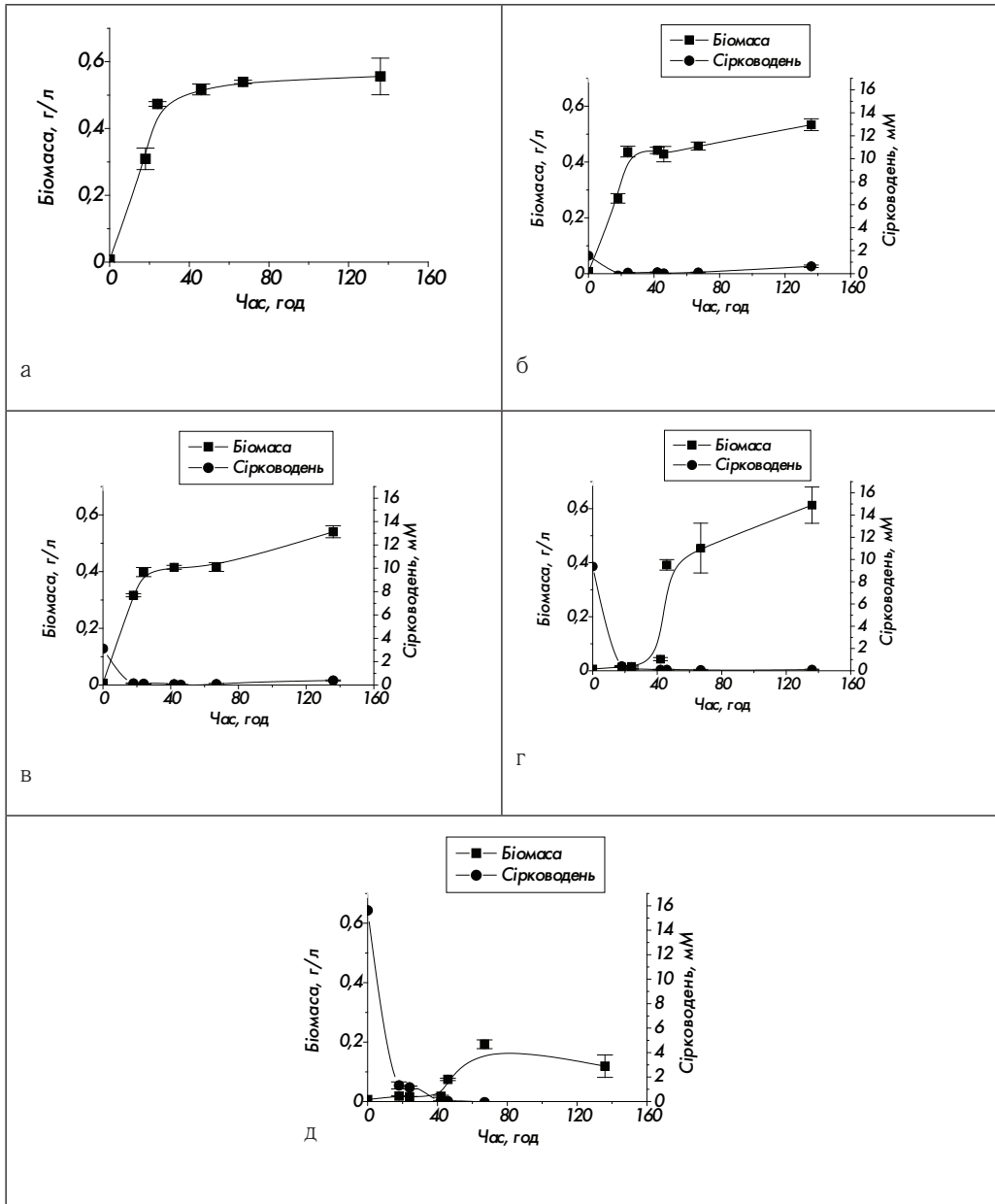


Рис. 1. Ріст *S. cerevisiae* у середовищах з різними концентраціями сірководню: а – без сірководню (контроль), б – 1,56 мМ, в – 3,1 мМ, г – 9,4 мМ, д – 15,6 мМ (аеробні умови)

Fig. 1. *S. cerevisiae* growth in media with different concentrations of hydrogen sulfide under aerobic conditions: а – without hydrogen sulfide (control), б – 1.56 mM, в – 3.1 mM, г – 9.4 mM, д – 15.6 mM (aerobic conditions)

Збільшення концентрації цієї сполуки до 3,1 мМ суттєво не впливало на ріст дріжджів (рис. 1, в). При вихідній концентрації сірководню 9,4 мМ ріст дріжджів протягом першої доби був практично відсутній (рис. 1, г). Однак, на другу добу культивування ріст дріжджів відновлювався і досягав рівня контрольного варіанту. Більш висока концентрація сірководню в середовищі (15,6 мМ) інгібувала ріст дріжджів. Деяке відновлення росту спостерігали після 40 годин культивування, але рівень нагромадження біомаси був майже в 4 рази меншим, ніж у контрольному варіанті (рис. 1, д). Очевидно, в клітинах за наявності високих концентрацій сірководню відбувалися незворотні зміни, які позначалися на ростових процесах.

Відновлення росту *S. cerevisiae* у середовищі з концентрацією сірководню 9,4 мМ, очевидно, пов'язане з його випаровуванням і окисненням за аеробних умов. У зв'язку з цим був проведений експеримент, у якому концентрацію сірководню в середовищі підтримували на постійному рівні протягом усього часу культивування, для чого вимірювали вміст сірководню в середовищі через кожні 8 - 10 год і доводили його вміст до вихідної концентрації. На рис. 2 показано ріст дріжджів *S. cerevisiae* за наявності 9,4 мМ сірководню в середовищі. Результати цього експерименту показали, що рівень сірководню в середовищі в процесі культивування дріжджів швидко знижується, однак додаткове внесення Na_2S до вихідного рівня (9,4 мМ) супроводжується повним інгібуванням росту культури.

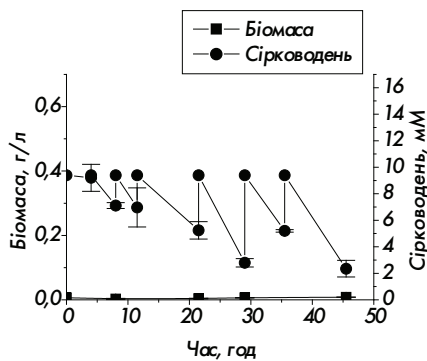


Рис. 2. Ріст *S. cerevisiae* у середовищі з концентрацією сірководню 9,4 мМ.

Через 8-10 год концентрацію сірководню доводили до початкової

Fig. 2. *S. Cerevisiae* grown in media with 9,4 mM hydrogen sulfide concentration. In 8-10 hours hydrogen sulfide concentration was reduced to initial concentration

За анаеробних умов (рис. 3) сірководень уже за концентрації 1,56 мМ інгібував ріст дріжджів приблизно в 4 рази. Ще більше пригнічення росту культури спостерігалось при концентрації H_2S 3,1 мМ (рис. 3, в). Подальше зростання концентрації сірководню супроводжувалося повним інгібуванням росту дріжджів *S. cerevisiae* (рис. 3, г, д). Можливо, що в аеробних умовах дія сірководню скерована на зв'язування заліза цитохромоксидази [11], а в анаеробних — цинку алкогольдегідрогенази [3]. Пригнічення росту може бути також пов'язане із комплексною дією сірководню на різні ферменти [15]. Крім того, токсична дія сірководню може бути наслідком деполяризації мембран [10].



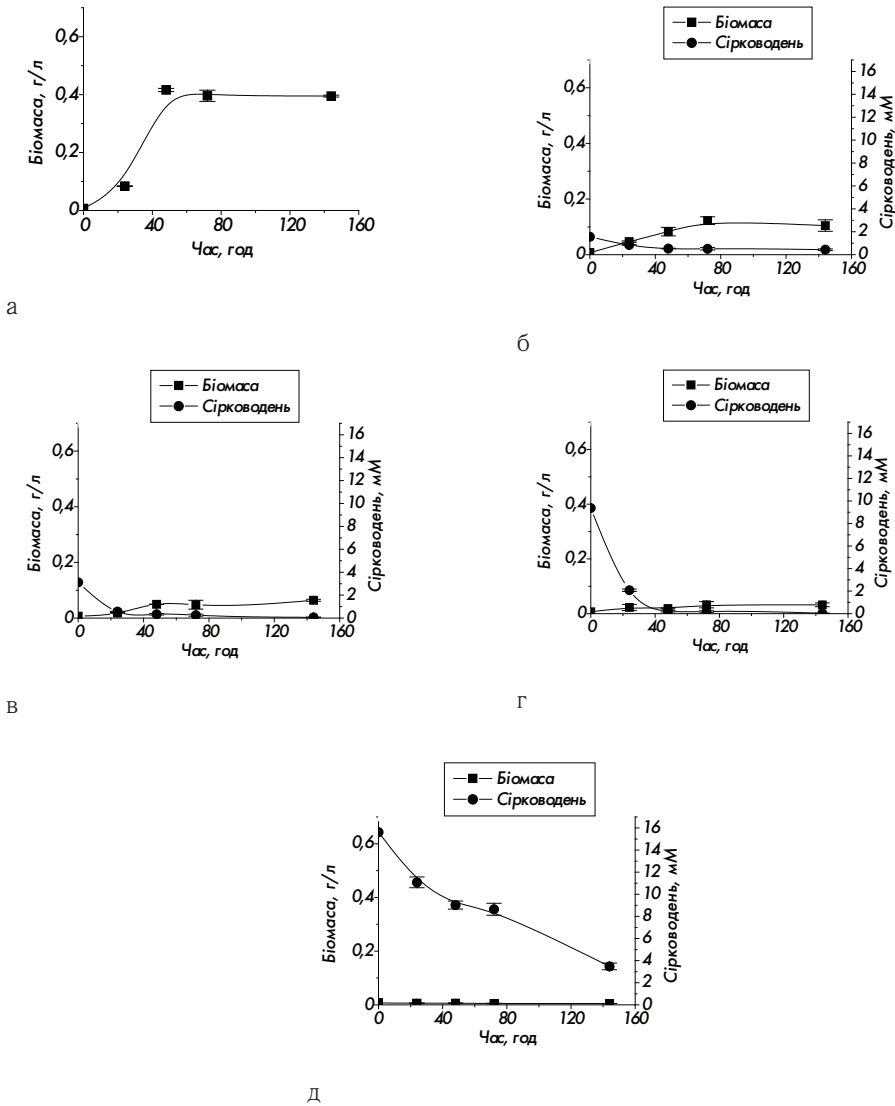


Рис. 3. Ріст *S. cerevisiae* у середовищах з різними концентраціями сірководню: а – без сірководню (контроль), б – 1,56 мМ, в – 3,1 мМ, г – 9,4 мМ, д – 15,6 мМ (анаеробні умови)

Fig. 3. *S. cerevisiae* growth in media with different concentrations of hydrogen sulfide under anaerobic conditions: а – without hydrogen sulfide (control), б – 1.56 mM, в – 3.1 mM, д – 9.4 mM, е – 15.6 mM (anaerobic conditions)

На електронномікроскопічних фотографіях досліджуваних дріжджів після їх оброблення гідроген сульфідом концентрацією 9,4 мМ видно, що в ультраструктурі клітин відбуваються помітні зміни. Вони, як видно з рис. 4, торкаються в першу чергу змін зовнішнього мананопротейнового шару клітинної стінки, а також цитоплазматичної мембрани. Помітні зміни спостерігаються у вакуолі.

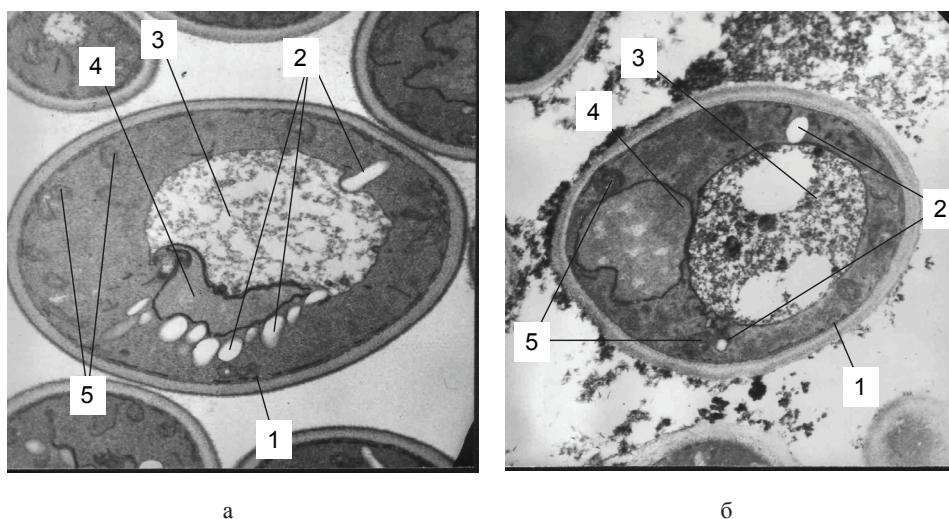


Рис. 4. Вплив сірководню на ультраструктуру клітин *S. cerevisiae*
 а — клітини, вирощені без сірководню (контроль), б — клітини, вирощені при концентрації сірководню 9,4 мМ
 1 — цитоплазматична мембрана, 2 — включення жиру, 3 — вакуоля, 4 — ядро, 5 — мітохондрії

Fig. 4. Hydrogen sulfide effect upon cell ultrastructure of *S. cerevisiae*:
 а — cells grown without hydrogen sulfide (control), б — cells grown under hydrogen sulfide concentration 9.4 mM
 1 — cytoplasmic membrane, 2 — fat inclusions, 3 — vacuole, 4 — nucleus, 5 — mitochondria

Оскільки сірководень виявляє генотоксичну [4] та канцерогенну [8] дію, нами було досліджено мутагенну активність цієї сполуки. Для цього спочатку дослідили вплив різних концентрацій сірководню на виживання дріжджів за різного часу контакту клітин з ним. Сірководень в концентрації 1,56 мМ при 45 хв інкубації не спричиняв загибелі клітин (рис. 5).

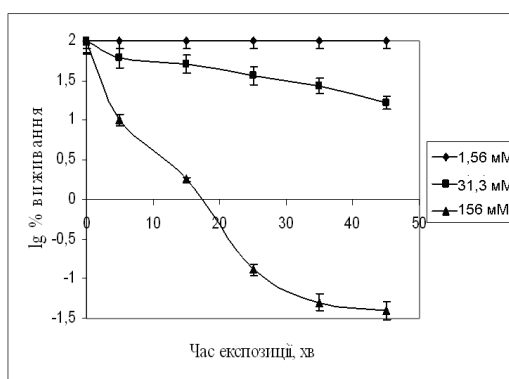


Рис. 5. Вплив різних концентрацій сірководню на виживання *S. cerevisiae* D-67-S
Fig. 3. Hydrogen sulfide different concentrations effect upon *S. cerevisiae* D-67-S survival



Збільшення концентрації сірководню до 31,3 мМ при такому ж часі експозиції спричиняло загибель клітин на рівні 84 %, а при концентрації 156 мМ він спричиняв загибель 98 % клітин протягом 15 хв. Для дослідження мутагенної дії сірководню використовували 45-хвилинне оброблення клітин сірководнем в концентрації 31,3 мМ, що забезпечувало 16 % виживання клітин (рис. 5.)

Було обстежено 93 тис. колоній і виявлено, що 21 з них при перенесенні у мінімальне середовище не росла. Багаторазові пересіви їх у рідке мінімальне середовище підтвердило, що вони втратили здатність синтезувати певні метаболіти і, таким чином, є ауксотрофними мутантами (табл. 1).

Частота виникнення ауксотрофних мутацій під впливом сірководню становила $2,26 \cdot 10^{-4}$.

Таблиця 1

Ріст індукованих сірководнем мутантів *S. cerevisiae* D-67-S у рідких середовищах

Table 1

Growth of *S. cerevisiae* D-67-S mutants induced by hydrogen sulfide

Штам	Біомаса після 24 год росту, г/л	
	Максимальне середовище	Мінімальне середовище
<i>S. cerevisiae</i> D-67-S	0,588 ± 0,007	0,493 ± 0,031
1	0,629 ± 0,011	0,023 ± 0,001
2	0,634 ± 0,007	0,019 ± 0,001
3	0,676 ± 0,004	0,023 ± 0,001
4	0,591 ± 0,019	0,028 ± 0,001
5	0,644 ± 0,006	0,028 ± 0,001
6	0,668 ± 0,003	0,024 ± 0,002
7	0,529 ± 0,009	0,021 ± 0,001
8	0,460 ± 0,003	0,013 ± 0,001
9	0,377 ± 0,024	0,011 ± 0,001
10	0,628 ± 0,006	0,027 ± 0,001
11	0,615 ± 0,007	0,010 ± 0,001
12	0,652 ± 0,006	0,013 ± 0,001
13	0,605 ± 0,010	0,011 ± 0,001
14	0,623 ± 0,003	0,010 ± 0,002
15	0,465 ± 0,003	0,013 ± 0,001
16	0,632 ± 0,006	0,013 ± 0,001
17	0,461 ± 0,005	0,022 ± 0,001
18	0,605 ± 0,004	0,016 ± 0,001
19	0,590 ± 0,009	0,014 ± 0,001
20	0,455 ± 0,010	0,009 ± 0,001
21	0,464 ± 0,002	0,011 ± 0,001



Таким чином, одержані нами результати показують, що сірководень виявляє і токсичну, і мутагенну дію на дріжджі *S. cerevisiae*. Токсична дія цієї сполуки проявляється як у аеробних, так і у анаеробних умовах. Крім того, сірководень спричиняє зміни в ультраструктурі клітинної стінки, цитоплазматичної мембрани та вакуолі.

Автори висловлюють щирю подяку провідному науковому співробітнику міжфакультетської лабораторії електронної мікроскопії Львівського національного університету імені Івана Франка О. Р. Кулачковському за проведення електронномікроскопічних досліджень.

Робота частково виконана за рахунок коштів Державного бюджету України в рамках проекту Державного фонду фундаментальних досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
2. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии /* Под. ред. Н. С. Егорова. — М.: МГУ, 1983. — 215 с.
3. *Страер Л.* Биохимия: Пер. с англ. — М.: Мир, 1984. — Т. 1. — 232с.
4. *Attene-Ramos M. S., Wagner E. D., Plewa M. J., Gaskins H. R.* Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent // *Mol. Cancer Res.* — 2006. — V. 4, № 1. — P. 9–14.
5. *Burkholder P.* Influence of some environmental factors upon the production of riboflavin by yeasts // *Arch. Biochem.* — 1943. — V. 1, № 1. — P. 121–130.
6. *Cohen Y., Jorgensen B. B., Revsbech N. P., Poplawski R.* Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria // *Appl. Env. Microbiol.* — 1986. — V. 51, № 2. — P. 398-407.
7. *Dean G. A.* A simple colorimetric finish for the Johnson-Nishita micro-distillation of sulfur // *The Analyst.* — 1966 — V. 91, № 1085. — P. 530-532.
8. *Huycke M. M., Gaskins H. R.* Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models // *Experimental Biology and Medicine.* — 2004. — V. 229. — P. 586–597.
9. *Hydrogen sulfide: human health aspects [Electronic resource] /* World health organization: Cicads 53. — Geneva, 2003. — Access mode: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad53.htm>
10. *Julian D., April K L., Patel S., Stein J. R., Wohlgemuth S. E.* Mitochondrial depolarization following hydrogen sulfide exposure in erythrocytes from a sulfide-tolerant marine invertebrate // *Journ. Experim. Biol.* — 2005. — V. 208, № 21. — P. 4109-4122.
11. *Khan A. A., Schuler M. M., Prior M. G., Yong S., Coppock R. W., Florence L. Z., Lillie L. E.* Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats // *Tox. Appl. Pharm.* — 1990. — V. 103. — P. 482–490.
12. *Kuster E., Dorusch F., Altenburger R.* Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia Magna* // *Environ. Toxicol. Chem.* — 2005. — V. 24, № 10. — P. 2621-2629.
13. *Lloyd K. G., Edgcomb V. P., Molyneaux S. J., Boer S., Wirsén C. O., Atkins M. S., Teske A.* Effects of dissolved sulfide, pH, and temperature on growth and survival of marine hyperthermophilic Archaea // *Appl. Env. Microbiol.* — 2005. — V. 71, № 10. — P. 6383–6387
14. *Miller S. R., Bebout B. M.* Variation in sulfide tolerance of photosystem II in phylogenetically diverse cyanobacteria from sulfidic habitats // *Appl. Env. Microbiol.* — 2004. — V. 70, № 2. — P. 736-744.
15. *Reiffenstein R. J., Hulbert W. C., Roth S. H.* Toxicology of hydrogen sulfide // *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.* — 1992. — V.32. — P. 109–134.
16. *Reynolds E. S.* The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *J. Cell. Biol.* — 1963. — V. 17. — P. 208-212.



А. А. Галушка, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, г. Львов, 79005, Украина, e-mail: a_halushka@mail.ru

ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Реферат

Исследован рост *Saccharomyces cerevisiae* в средах с различными концентрациями сероводорода. Сероводород при концентрации 9,4 мМ полностью угнетает рост дрожжей в аэробных и анаэробных условиях. На электронно-микроскопических фотографиях клеток, обработанных сероводородом, хорошо видны изменения в клеточной стенке, цитоплазматической мембране и вакуоле.

Обработка клеток сероводородом концентрацией 31,3 мМ на протяжении 45 мин обеспечивает 16 % выживания дрожжей. Выделены ауксотрофные мутанты из клеток, обработанных сероводородом.

К л ю ч е в ы е с л о в а: сероводород, *Saccharomyces cerevisiae*, токсичность, мутагенность, ультраструктура.

A. A. Halushka, T. B. Peretyatko, S. P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Grushevskiy st., Lviv, 79005, Ukraine,
tel.: 8 (032) 239 40 53, e-mail: a_halushka@mail.ru

INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE ON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Summary

The growth of *Saccharomyces cerevisiae* in media with different hydrogen sulfide concentrations is investigated. At concentration of 9.4 mM hydrogen sulfide fully inhibited the growth of yeasts under aerobic and anaerobic conditions. On electron-microscopic photographs of the cells, treated with hydrogen sulfide, the changes in the cell wall, cytoplasmic membrane and vacuole are observed.

Cells treatment by hydrogen sulfide at concentration of 31.3 mM for 45 min caused 16 % of yeasts' survival. The auxotrophic mutants have been isolated from cells treated by hydrogen sulfide.

K e y w o r d s: hydrogen sulfide, *Saccharomyces cerevisiae*, toxicity, mutagenicity, ultrastructure.



**Н.М. Жданова, С.В. Олішевська, А.І. Василевська,
В.Л. Айзенберг, І.М. Курченко, Л.В. Артишкова, Л.Т. Наконечна,
Г.П. Капічон**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д 03680, Україна
тел.: 8 (044) 526 11 89; e-mail: snezhanaolsh@rambler.ru

СКРИНІНГ ШТАМІВ МІКРОМІЦЕТІВ, ЩО ЗДАТНІ РОСТИ ТА РУЙНУВАТИ ЦЕЛЮЛОЗОВМІСНИЙ СУБСТРАТ

*Досліджено 700 штамів мікроскопічних грибів, віднесених до 151 виду 57 родів. Гриби виділені з екопів природного та антропогенного походження: забруднених важкими металами ґрунтів, забруднених радіонуклідами лісової підстилки, ґрунтів зони відчуження ЧАЕС, уражених грибами книг, поверхні стін тощо. Показано, що інтенсивність росту та ступінь руйнування фільтрувального паперу проявлялися на рівні виду та штаму грибів. Виявлено 48 штамів серед видів родів *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Corynascus*, *Emericella*, що через 21 добу руйнували фільтрувальний папір.*

К л ю ч о в і с л о в а: скринінг, мікроскопічні гриби, руйнування фільтрувального паперу.

Відомо, що в природі щорічно кількість целюлозо- та лігнінвмісної фітомаси рослинних решток становить близько 1×10^{13} тон, в тому числі відходів підприємств сільського господарства та різних галузей промисловості. В ферментативному руйнуванні целюлози та лігніну беруть участь, як правило, різні групи бактерій та грибів. Серед останніх суттєва роль належить мікроскопічним грибам [1 – 8]. Рослинні відходи різного типу шляхом гідролізу за участю грибних або мікробних целюлаз можуть бути використані для отримання біопалива (етанолу) як альтернативного нафті та її продуктам джерела палива [8, 9].

Метою представленої роботи було вивчення здатності різних видів та штамів мікроскопічних грибів рости та руйнувати целюлозовмісний субстрат.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були 700 штамів мікроскопічних грибів, що ідентифіковані до 151 виду 57 родів. Штами грибів зберігаються в музеї культур відділу фізіології та систематики мікроміцетів ІМВ НАН України. Гриби були виділені з різних місць природного та антропогенного походження, а саме: забруднених важкими металами (переважно іонами Cu^{+2}) ґрунтів ряду областей України, забруднених радіонуклідами лісової підстилки, ґрунтів зони відчуження ЧАЕС, а також з уражених грибами книг, поверхні стін тощо.

© Н.М. Жданова, С.В. Олішевська, А.І. Василевська, В.Л. Айзенберг, І.М. Курченко, Л.В. Артишкова, Л.Т. Наконечна, Г.П. Капічон, 2008



Для визначення здатності штамів грибів рости та руйнувати целюлозовмісний субстрат користувалися класичним методом, в якому фільтрувальний папір слугував єдиним джерелом вуглецю [10]. Досліди виконували в 3-х повторностях в умовах стаціонарного культивування при 25 ± 2 °С, облік проводили протягом 7, 14, 21-ї доби і до 2-х місяців. Характер колонізації грибами фільтрувального паперу та ступінь його руйнування визначали візуально за п'ятибальною шкалою. За контроль приймали середовище з грибним інокулюмом (без внесення фільтрувального паперу) та середовище з фільтрувальним папером (без внесення грибного інокулюму). В подальшому активні щодо руйнування фільтрувального паперу штами грибів були проведені через декілька пасажів, щоб підтвердити прояв цієї властивості.

Результати та їх обговорення

Серед досліджених найбільшою кількістю штамів були представлені види родів відділу анаморфних грибів — мітоспорові гриби родин *Moniliaceae* і *Dematiaceae*, у понад 5 разів меншою кількістю — відділів *Ascomycota* та найменшою — *Zygomycota* (рис. 1 А, Б, В). Решта родів грибів представлені поодинокими видами та одним-двома штамами.

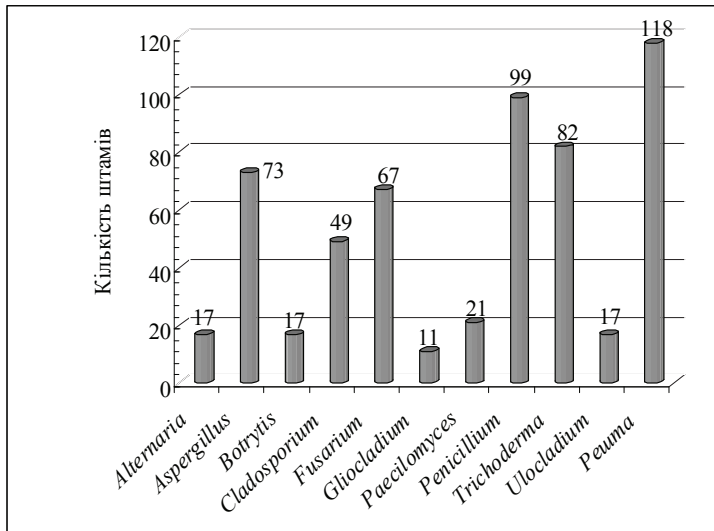


Рис. 1. Роди мітоспорових грибів (А), грибів відділів *Zygomycota* (Б) та *Ascomycota* (В), досліджені щодо росту на фільтрувальному папері

Fig 1. Strains of mitosporic (A), *Zygomycota* (B) and *Ascomycota* (B) fungi investigated respecting to the growth on the filter paper

Результати проведених досліджень показали, що 85 штамів мікроміцетів (що становить 8,2 % від загальної кількості вивчених) не здатні до росту в наведених умовах, що може бути обумовлено їх фізіолого-біохімічними особливостями. Решта штамів грибів росли на фільтрувальному папері, причому переважна більшість (понад 60 %) за оцінкою 3 — 4 бали. Значно менша кількість (48, що становить майже 7 %) штамів грибів руйнувала субстрат за оцінкою 5 балів, тобто за наявності в зразках фільтрувального паперу “зон просвітління” та розриву. Саме такий

характер руйнування паперу протягом 21-ї доби вважали першорядним критерієм добору активних штамів грибів.

Слід зазначити, що 46 досліджених штамів родів *Penicillium*, *Aspergillus* та *Myrothecium*, *Chaetomium*, переважно темнопигментованих (меланінвмісних) *Botrytis*, *Ulocladium*, інтенсивно росли на папері, але руйнували його за довший період (протягом одного – двох місяців).

Отримані нами результати свідчать, що найбільша кількість штамів мікроміцетів – деструкторів фільтрувального паперу виявлена у видів родів *Trichoderma* та *Penicillium* і вдвічі менше – у *Aspergillus* та *Fusarium* (рис. 2).

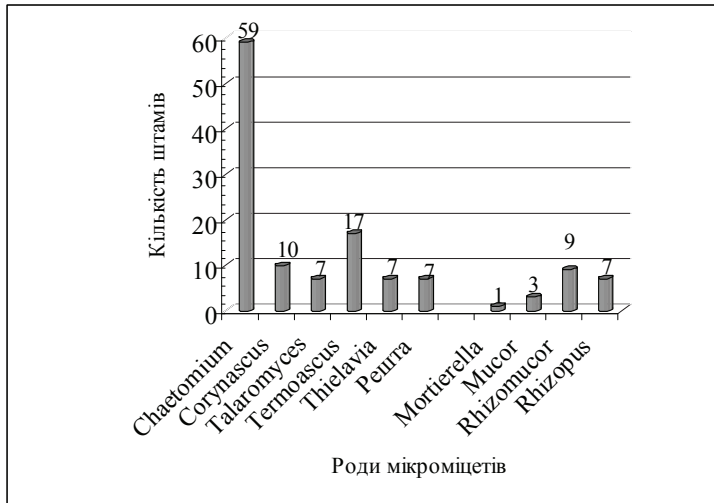


Рис. 2. Розподіл штамів мікроміцетів-деструкторів фільтрувального паперу по родах

Fig 2. Distribution of micromycetes-destroyers strains of the filter paper respecting to geneza

При дослідженні родини Moniliaceae з 10 видів (82 штами) роду *Trichoderma* 5 видів (16 штамів): *T. viride*, *T. harzianum*, *T. polysporum*, *T. parceranosum*, *Trichoderma sp.* інтенсивно руйнували фільтрувальний папір (рис. 2). Серед 35 видів (99 штамів) роду *Penicillium* здатність щодо деструкції субстрату виявили у 6 видів (11 штамів): *P. jenseni*, *P. funiculosum*, *P. velutinum*, *P. sclerotiorum*, *P. multicolor*, *P. waksmani*). Серед 10 видів (73 штами) роду *Aspergillus* інтенсивним ростом та деструкцією субстрату відрізнялись 4 штами (з 8 досліджених) *A. flavipes*. За даними деяких авторів (Свиридова із співавт., 2001), мікроміцети родів *Aspergillus* та *Penicillium* беруть участь у більш глибокій трансформації целюлозовмісних субстратів, ніж представники роду *Trichoderma*, зокрема, через більшу збалансованість комплексів целюлозолітичних ферментів у пеніциліїв. При цьому комплекс целюлозолітичних ферментів грибів роду *Trichoderma* здатен гідролізувати як нативну целюлозу, так і її розчинні похідні [4, 8].

З 11 видів (67 штамів) роду *Fusarium* було виявлено 6 активних штамів одного виду *F. oxysporum*, що відомий як фітопатоген. Всього 2 активних штами (серед 11 досліджених) виявлено серед 2 видів роду *Gliocladium*.

На фільтрувальному папері не росли 4 види роду *Paecilomyces* (21 штам), *Metarrhizium anisopliae* (7 штамів), поодинокі штами *Beauveria bassiana* та *Acremonium humicola*.

З досліджених 34 видів (176 штамів) родини Dematiaceae виявлено лише один штам *Curvularia inaequalis*, який руйнував папір через 1 місяць росту. За даними літератури, активні целюлозолітики відомі серед видів роду *Alternaria* та *Cladosporium* [1, 4], але у наших дослідженнях серед 5 видів роду *Cladosporium* (49 штамів), *Alternaria alternata* (17 штамів) та *Aureobasidium pullulans* (12 штамів) не виявлено активних штамів, що, певно, може бути обумовлено їх фізіолого-біохімічними особливостями. При цьому майже половина штамів грибів цієї родини, зокрема всі штами *Metarrhizium anisoplea*, окремі штами родів *Cladosporium*, *Humicola*, *Hormoconis* та інші зовсім не росли на фільтрувальному папері.

Серед 7 видів грибів відділу Zygomycota (20 штамів) було досліджено поодинокі штами *Mortierella vinacea*, *Mucor plumbeus*, *Rhizopus stolonifer* (7 штамів), *Rhizomucor pusillus* (8 штамів). Лише один штам *Rhizopus stolonifer* (з 4 досліджених) руйнував фільтрувальний папір через 1,5 місяця росту. Решта штамів характеризувалася низькою здатністю до росту на вказаному субстраті, чим підтверджується загальновідома назва цих видів як “цукристі”.

Серед грибів відділу Ascomycota було досліджено 8 видів (59 штамів) роду *Chaetomium*. Серед них деструкцію целюлозовмісного субстрату через 1 - 2 місяці росту спостерігали лише у окремих штамів *Ch. globosum*, *Ch. aureum* та *Ch. cochlioides* (всього 10 штамів).

Штами термотолерантних грибів *Corynascus sp.* (чотири з дев'яти досліджених) та *Emericella sp.* (один з двох досліджених) активно руйнували фільтрувальний папір. На середовищі з фільтрувальним папером не росли *Thermoascus aurantiacus* (7 штамів з 10) та *T. termophylus* (2 досліджені штами).

Таким чином, в нашій роботі показано, що переважна більшість досліджених штамів мікроскопічних грибів, виділених з екоотопів антропогенного та природного походження, здатна рости на фільтрувальному папері та 7 % їх в короткий термін (через 21 добу) руйнувати субстрат з утворенням “зон просвітління” та розриву.

Отримані нами результати в основному узгоджуються з даними літератури, що серед чисельної кількості видів мікроміцетів активними целюлозолітиками переважно є гриби родів *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* [1, 2, 8]. В наших дослідженнях активні штами виявлено у *Trichoderma* – 19, 5 %, *Penicillium* – 11, 1 %, *Fusarium* – 9, 0 % та *Aspergillus* – 8, 2 % (від загальної кількості штамів кожного з родів).

Показано, що інтенсивність росту та ступінь руйнування фільтрувального паперу проявлялися на рівні виду та штаму грибів.

Відібрані штами мікроміцетів будуть слугувати об'єктами для подальших досліджень як потенційні агенти біотехнологічної конверсії целюлозовмісних відходів різноманітних галузей промисловості.

Робота виконувалась за підтримки цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України № 19 на 2007–2009 рр. “Біомаса як паливна сировина” (“Біопалива”).



ЛІТЕРАТУРА

1. Лизак Ю. Целлюлозолитические свойства некоторых видов темноокрашенных гифомицетов // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — К., 1971. — 23 с.
2. Колеснева Г. Целлюлозолитические свойства грибов рода *Penicillium* // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — К., 1972. — 27 с.
3. Мусич Е. Г. Целлюлозоразрушающие грибы в разных типах почв Украинской ССР // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — К., 1975. — 22 с.
4. Билай В. И., Билай Т. И., Мусич Е. Г. Трансформация целлюлозы грибами. — Киев: Наук. думка, 1982. — 296 с.
5. Исаева Е. В., Рязанова Т. В., Чупрова Н. А. Биоконверсия твердого остатка вегетативной части тополя и топинамбура // Химия растительного сырья.— 2002, № 2. — С. 149–150.
6. Варнайте Р. Н., Раудонене В. З. Биоконверсия растительных отходов озимой ржи микромицетами // Микология и фитопатология. — 2004. — 38, № 6.—С. 80–83.
7. Терехова В. А., Семенова Т. А. Структура сообществ микромицетов и их синэкологические взаимодействия с базидиальными грибами в ходе разложения растительных остатков // Микробиология. — 2005. — 74, № 1.— С. 104–110.
8. *Renewable biological systems for alternative sustainable energy production* (FAO Agricultural Services Bulletin — 128) / Ed by Kazuhisa Miyamoto. — Osaka, Japan: FAO, 1997. — 486 p.
9. Рабинович М. Л. Производство этанола из целлюлозосодержащих материалов: потенциал российских разработок // Прикладная биохимия и микробиол. — 2006. — 42, № 1. — С. 5–32.
10. *Методы экспериментальной микологии*. Справочник / Под ред. В. И. Билай. — Киев: Наук. думка, 1982. — 561 с.

**Н. Н. Жданова, С. В. Олишевская, А. И. Василевская,
В. Л. Айзенберг, И. Н. Курченко, Л. В. Артышкова,
Л. Т. Наконечная, А. П. Капичон**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, Д 03680, Украина
тел.: 8 (044) 526 11 89; e-mail: snezhanaolsh@rambler.ru

СКРИНИНГ ШТАММОВ МИКРОМИЦЕТОВ, СПОСОБНЫХ РАСТИ И РАЗРУШАТЬ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИЙ СУБСТРАТ

Реферат

Исследовано 700 штаммов микроскопических грибов, отнесенных к 151 виду 57 родов. Грибы выделены из экотопов природного и антропогенного происхождения: загрязненных тяжелыми металлами почв, загрязненных радионуклидами лесной подстилки, почв зоны отчуждения ЧАЭС, пораженных грибами книг, поверхности стен. Показано, что интенсивность роста и степень разрушения фильтровальной бумаги проявлялись на уровне вида и штамма грибов. Выявлены 48 штаммов среди видов родов *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Corynascus*, *Emericella*, способные через 21 сутки разрушать фильтровальную бумагу.

К л ю ч е в ы е с л о в а: скрининг, микроскопические грибы, разрушение фильтровальной бумаги.



**N. M. Zhdanova, S. V. Olishevskaya, A. I. Vasylevska, I. M. Kurchenko,
V. L. Ayzenberg, V. L. Artysheva, L. T. Nakonechna, G. P. Kapichon**

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU,
akad. Zabolotnogo str., 154, Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine
tel.: 8 (044) 526 11 89; e-mail: snezhanaolsh@rambler.ru

SCREENING OF MICROMYCETES STRAINS GROWN AND DISRUPTED THE CELLULOSE SUBSTRATE

Summary

The screening of fungi which are able to grow and disrupt the cellulose substrate has been performed among 700 strains of 151 species of 57 genera. These fungi were isolated from different natural and anthropogenic ecotopes: heavy metals polluted soils, radioactive forest litter, radioactive substrates of the alienation zone from Chernobyl Nuclear Power Plant, books and walls contaminated by microfungi. It has been shown that the degree of filter paper disruption depended on species and interspecies variation. It was found 48 strains of genera *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Corynascus*, *Emericella* rapidly grown and disrupted filter paper through 21 days.

Key words: screening, microfungi, disruption of filter paper.



Н. В. Ліманська, А. М. Венгер, Є Шуай, В. О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (048) 68 79 64, e-mail: limty@mail.ru

ВИВЧЕННЯ АДГЕЗИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМІВ ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ ВІНОГРАДУ

*Модифіковано методика визначення адгезивності бактерій на рослинних тканинах. Вивчено адгезивні властивості 13 штамів *Rhizobium vitis*, виділених з винограду, ґрунту виноградників, і штаму *R. radiobacter*, виділеного з троянд. Показано, що штами патогенних ризобій на чотирьох тест-рослинах характеризувалися різними рівнями адгезивності (від $690,0 \pm 40,0 \cdot 10^2$ до $0,9 \pm 0,1$ КУО/мм²). Найбільша кількість клітин патогенних ризобій прикріплювалися до тканин винограду і троянд, а найменша – до тканин хризантеми і каланхоє.*

К л ю ч о в і с л о в а: бактеріальний рак, адгезія, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*.

Популяції патогенних штамів *R. vitis* і *R. radiobacter* (за минулою номенклатурою – *Agrobacterium vitis* і *A. tumefaciens* [13]) характеризуються значною мінливістю. Так, з однієї пухлини рослини, штучно зараженої патогенним штамом, можуть виділятися штами, відмінні від попереднього за низкою ознак [6].

Адгезивність – один з факторів вірулентності патогенних штамів *R. vitis* [1]. У літературі недостатньо даних щодо вивчення рівня адгезивності у даних фітопатогенів. Відомо, що штамам *R. vitis* притаманний різний рівень адгезивності [7]. Враховуючи той факт, що *R. vitis* спричиняє значні збитки виноградарству України [4, 5], актуальними є дослідження, які стосуються вивчення факторів вірулентності даних фітопатогенів.

Метою роботи було виділення штамів з природної популяції збудників бактеріального раку – з рослин та ґрунту виноградника та вивчення їх здатності до адгезії.

Матеріали і методи

Штами збудника бактеріального раку виділяли за описаною раніше методикою та ідентифікували методом ПЛР з використанням праймерів до послідовностей *ipt* та *virD₂* [3, 10]. Окремі штами використовували для зараження тест-рослин (зелених чубуків винограду і каланхоє). У виділених штамів вивчали здатність до адгезії на рослинних тканинах. Адгезивні властивості вивчали також у штаму *R. radiobacter* P2, виділеного нами з троянд і здатного спричиняти пухлини на винограді, та у колекційного штаму *R. vitis* АТ1, люб'язно наданого доктором Е. Szegedi (Угорщина). Крім того, для порівняння досліджували здатність до адгезії на тканинах винограду штамів *Escherichia coli* УКМ В-506 і *Bacillus subtilis* ОНУ-25.



Адгезивні властивості вивчали за модифікованою нами методикою Brisset et al., (1991). Замість фрагментів коренів для вивчення здатності штамів до адгезії використовували фрагменти рослинних тканин, які отримували наступним чином. Здерев'янілі чубуки винограду ретельно мили з детергентом під проточною водою, ополіскували, очищували від кори і в асептичних умовах подрібнювали на фрагменти 3x2x1 мм за картонним шаблоном. Пагони троянд, хризантеми і каланхое ретельно мили, ополіскували, поміщали у розчин 70 % етилового спирту на 3 - 5 секунд, ополіскували у стерильній воді та подрібнювали на фрагменти 3x2x1 мм. У якості тест-рослин використовували виноград, троянду, хризантему, каланхое. Виноград, троянди та хризантеми було обрано у якості об'єктів дослідження через те, що в умовах помірного клімату патогенні ризобії найчастіше уражують саме ці рослини [11]. Каланхое — це тест-рослина, яка часто використовується у діагностиці бактеріального раку [1].

Готували суспензії бактеріальних клітин концентрацією 10^{10} кл/мл. Для постановки досліду використовували стерильні пластикові планшети для імунологічних досліджень. У лунку планшети вносили по 150 мкл суспензії бактеріальних клітин і фрагмент тканини тест-рослин. Контролем слугували лунки планшет зі стерильною водою, в які поміщали фрагменти досліджених тест-рослин. Постановка контролю дозволяла виявити природню мікробіоту, яка містилася у рослині і залишалася після дезинфекції.

Після години інкубації при кімнатній температурі фрагменти рослинних тканин поміщали у 1,5 мл епендорфи із стерильною дистильованою водою і 10 секунд струшували на вортексі. Відмивання повторювали ще раз у другому епендорфі, а після цього тканини розтирали у 1,5 мл 10 мМ ХЕПЕС, рН 7,5. По 100 мкл суспензії розтертої тканини висівали на чашки Петрі з середовищем YPGA [12]. Досліди проводили у п'яти повторностях. Після двох діб культивування при 28 °С обраховували кількість колоній, що вирости, і знаходили кількість колоній утворюючих одиниць (КУО) на 1 мм² площі прикріплення, враховуючи те, що загальна площа фрагмента рослинної тканини становила 22 мм². Отримані дані обробляли методами математичної статистики на основі пакета прикладних програм "Statistica 6.0" ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення

З 42 досліджених зразків ґрунту та рослин винограду сортів Каберне Совіньон і Мерло було виділено 12 штамів збудника бактеріального раку (штами *R. vitis* 201, *R. vitis* 2, *R. vitis* 412 — з ґрунту, решта штамів — із здерев'янілої лози).

Результати досліджень показали, що рівень адгезивності штамів *R. vitis*, виділених як з лози, так і ґрунту, і *R. radiobacter* був різним в залежності від штаму та дослідженої тест-рослини і коливався від 700 ± 40 до $0,9 \pm 0,1$ КУО/мм² (табл.). Оскільки у контролях спостерігався ріст природньої мікробіоти рослин, ми обчислювали значення рівня адгезивності досліджених штамів з урахуванням кількості КУО/мм² у контролі, для чого від дослідного значення адгезивності віднімали контрольне.

Низький рівень адгезії досліджених штамів у порівнянні з даними попередніх авторів щодо адгезивності патогенних ризобій [7], ймовірно, пояснюється відмінностями у вірулентному потенціалі штамів або впливом ендогенної мікробіоти використаних тест-рослин.



Таблиця

Рівень адгезивності штамів на різних тест-рослинах, КУО/мм²

Tabl.

Attachment level of strains on the different test-plants, CFU/mm²

Штам	Тест-рослина			
	Виноград	Троянда	Хризантема	Каланхое
<i>R. vitis</i> AT1	28,0±5,0	30,0±11,0	20,2±6,1	27,0 ±3,8
<i>R. vitis</i> 14K1	2,7±0,7	2,3±0,6	20,1±1,9	3,2±0,2
<i>R. vitis</i> 18M	32,0±9,0	1,0±0,3	15,0±3,1	14,0±6,7
<i>R. vitis</i> 6MT	45,0±1,0	157,0±49,5	45,0±2,2	29,6±5,7
<i>R. radiobacter</i> P2	98,4±29,0	90,0±0,9	109,0±39,6	196,1±50,2
<i>R. vitis</i> C24	140,0±20,0	40,0±10,2	220,0±40,0	34,0±0,9
<i>R. vitis</i> 19M	88,3±19,7	95,0±16,0	6,4±0,1	138,3±60,4
<i>R. vitis</i> СМШ	690,0±40,0	29,7±5,1	97,0±40,3	22,0±4,8
<i>R. vitis</i> 6МШ	54,2±1,0	97,2±16,0	119,0±30,0	10,6±4,5
<i>R. vitis</i> 412	410,0±9,8	180,4±8,3	11,0±1,0	78,2±1,1
<i>R. vitis</i> 61MT	14,0±2,0	14,3±1,0	2,0±0,1	20,3±3,0
<i>R. vitis</i> 201	44,6±3,0	80,1±15,0	31,4±5,6	14,3±6,2
<i>R. vitis</i> 2	9,7±2,0	11,0±0,9	70,2±2,3	1,1±0,2
<i>R. vitis</i> 2Ш	30,0±3,8	0,9±0,1	20,4±3,2	1,1±0,1
<i>B. subtilis</i> ОГУ-25	15,0±2,0	НТ*	НТ	НТ
<i>E. coli</i> УКМ В-506	0,8±0,6	НТ	НТ	НТ

*НТ — зразки не тестувалися

Найбільший рівень адгезивності на усіх чотирьох тест-рослинах проявив штам *R. radiobacter* P2, найменший — штами *R. vitis* 14K1 і *R. vitis* 2Ш, виділені з лози винограду сорту Каберне Совіньон.

Адгезивний рівень штаму *B. subtilis* ОГУ-25 на винограді склав 15 ± 2 КУО мм². Відомо, що штами *B. subtilis* населяють рослинні тканини і можуть бути навіть антагоністами штамів збудника бактеріального раку [9]. Прикріплення клітин штаму *E. coli* УКМ В-506 до тканин винограду пояснюється тим, що бактерії родини *Enterobacteriaceae* здатні колонізувати рослини [8]. Адгезивність дослідженого штаму до рослинних тканин була невисокою ($0,8 \pm 0,6$ КУО/мм²).

Досліджені штами ризобій проявляли різний рівень адгезивності на усіх чотирьох тест-рослинах. Якщо порівнювати значення адгезивності, то найбільша кількість клітин патогенних ризобій прикріпилася до тканин винограду, а найменша — до тканин хризантеми і каланхое.

Отримані результати можна пояснити тим, що первинно досліджені штами були виділені з винограду, тому фактори патогенності найбільш ефективно проявляються по відношенню до цієї рослини. До тканин каланхое, яке є традиційною тест-рослиною, клітини ризобій виявили менший рівень адгезивності. Це може вказувати на те, що патогенний потенціал штамів проявляється щодо каланхое недостатньо. Дійсно, при зараженні дев'ятьма дослідженими патогенними штамами (*R. vitis* 14K1, *R. vitis* 18M, *R. vitis* 6MT, *R. vitis* C24, *R. vitis* 19M, *R. vitis* СМШ, *R. vitis* 6 МШ,



R. radiobacter P2) каланхоє і зелених чубуків винограду пухлиноутворення на всіх рослинах спостерігалось у разі інокуляції винограду. При зараженні каланхоє пухлиноутворення спричинили лише два штами (*R. vitis* 19M і *R. radiobacter* P2).

Різні рівні адгезивності штамів збудника бактеріального раку свідчать про відмінності у їх вірулентному потенціалі. Дані, отримані за допомогою модифікованої нами методики, дозволять провести порівняльні дослідження різноманітності штамового складу *R. vitis* і *R. radiobacter* на насадженнях уражених рослин.

Таким чином, досліджені штами збудників бактеріального раку винограду характеризуються різним ступенем адгезивності, що може бути свідченням гетерогенності природної популяції. Рівень адгезивності штамів різнився в залежності від тест-рослини, до тканин якої відбувалося прикріплення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Байдербек Р. Опухоли растений. — М.: Колос, 1981. — С. 114.
2. Маркова Ю. А., Романенко А. С., Духанина А. В. Выделение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* из растительных тканей // Микробиология. — 2005. — Т.74, № 5. — С. 663 — 666.
3. Милкус Б. Н., Конуп Л. О., Жунько І. Д., Ліманська Н. В. Тестування деяких сортів винограду на наявність збудника бактеріального раку і вірусів коротковоззля та скручування листя // Мікробіол. журн. — 2005. — Т. 67, № 1. — С. 41 — 48.
4. Милкус Б. Н., Лиманская Н. В., Жунько И. Д., Конуп Л. А., Бойко О. А. Выявление возбудителя бактериального рака в почве виноградника в разные сезоны вегетации // Виноградарство и виноделие: Сб. науч. тр. ИВиВ “Магарач”. — Ялта: ИВиВ “Магарач”, 2007. — С. 66 — 68.
5. Чернышева З. С., Назарчук В. С. Бактериальный рак как причина изреживания виноградных насаждений в Одесской области // Проблемы онкологии и тератологии растений. — Л.: Наука, 1975. — С. 155 — 157.
6. Belanger C., Canfield M., Moore L. W., Dion P. Genetic analysis of nonpathogenic *Agrobacterium tumefaciens* mutants arising in crown tumors // J. Bacteriol. — 1995. — 177, № 13. — P. 3752 — 3757.
7. Brisset M. N., Rodriguez-Palenzuela P., Burr T. J., Collmer A. Attachment, chemotaxis, and multiplication of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 and biovar 3 on grapevine and pea // Appl. Environm. Microbiol. — 1991. — 57, № 11. — P. 3178 — 3182.
8. Cooley M. B., Miller W. G., Mandrell R. E. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *E. coli* O157: H7 and competition by *Enterobacter asburiae* // Appl. Environm. Microbiol. — 2003. — V.69, № 8. — P. 4915 — 4926.
9. Eastwell K. C., Sholberg P. L., Sayler R. J. Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agents of crown gall disease of grapevines // Crop protection. — 2006. — 25, № 11. — P. 1191-1200.
10. Haas J. H., Moore L. W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environm. Microbiol. — 1995. — 61, № 8. — P. 2879 — 2884.
11. Manulis S., Chalupowicz L., Dror O., Kleitman F. Molecular diagnostic procedures for production of pathogen-free propagation material // Pest Manag. Science. — 2002. — 58. — P. 1126 — 1131.
12. Pionnat S., Keller H., Richer D. et al. Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries // Appl. Environm. Microbiol. — 1999. — 65, № 9. — P. 4197 — 4206.
13. Young J. M., Kuykendall L. D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajude et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis* // Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2001. — 51. — P. 89 — 103.



Н. В. Лиманская, А. Н. Венгер, Е Шуай, В. А. Иваница

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (048) 68 79 64, e-mail: limmy@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКУ ВИНОГРАДА

Реферат

Модифицирована методика определения адгезивности бактерий на растительных тканях. Изучены адгезивные свойства 13 штаммов *Rhizobium vitis*, выделенных из винограда и почвы виноградника, и штамма *R. radiobacter*, выделенного из розы. Показано, что штаммы патогенных ризобий на четырех тест-растениях характеризовались разными уровнями адгезивности (от $690,0 \pm 40,0$ до $0,9 \pm 0,1$ КОЕ/мм²). Наибольшее количество клеток патогенных ризобий прикреплялись к тканям винограда и розы, а наименьшее — к тканям хризантемы и каланхоэ.

К л ю ч е в ы е с л о в а: бактериальный рак, адгезия, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*.

N. V. Limanska, A. M. Venger, Ye Shuai, V. O. Ivanytsya

Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: 8 (048) 68 79 64, limmy@mail.ru

THE STUDY OF ATTACHMENT PROPERTIES OF GRAPE CROWN GALL AGENTS STRAINS

Summary

The method of bacterial attachment properties study on plant tissues was modified. The adhesive properties of 13 *Rhizobium vitis* strains isolated from grape and vineyard soil, and of the *R. radiobacter* strain isolated from rose were studied. It was shown that the strains of pathogenic rhizobia had different levels of adhesiveness (from $690,0 \pm 40,0$ to $0,9 \pm 0,1$ CFU/mm²). The greatest number of pathogenic rhizobia cells attached to grape and rose tissues and the least number — to chrysanthemum and kalanchoe tissues.

К e y w o r d s: crown gall, adhesion, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*.



В. В. Позур¹, Л. М. Сківка¹, Г. П. Потебня²

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

²Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ-22, 03022, Україна

РЕАКЦІЯ ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНІВ МИШЕЙ НА ПЕПТИДОГЛІКАН *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 В НОРМІ І ПРИ ПУХЛИННОМУ РОСТІ

У інтактних мишей та мишей з карциномою легені Льюїс досліджували вплив пептидоглікану (ПГ) Staphylococcus aureus Wood 46 на вагові індекси лімфоїдних органів та вміст у них мононуклеарних клітин. Показано, що найбільш виразні позитивні зміни досліджуваних лімфоїдних органів як у тварин без пухлин, так і у мишей з карциномою легені Льюїса спричиняв ПГ у мінімальній дозі (2 мкг/г). Відмінність реакції органів імунної системи на ПГ в нормі і при пухлинному рості полягала в тому, що у тварин з карциномою легені Льюїс введення препарату не мало достовірного впливу на досліджувані показники тимусу, на відміну від здорових тварин. Більш виразною у мишей-пухлиноносіїв була реакція селезінки. Слід також відмітити, що при пухлинному рості в ряді випадків прослідковувалася чітка дозова залежність впливу пептидоглікану Staphylococcus aureus Wood 46 на досліджувані характеристики лімфоїдних органів, тоді як у тварин без пухлини така залежність була практично відсутньою.

К л ю ч о в і с л о в а: пептидоглікан Staphylococcus aureus Wood 46, карцинома легені Льюїс, лімфоїдні органи.

Субклітинні компоненти та метаболіти бактеріальних клітин — потужні біологічно активні субстанції, які характеризуються імуномодуляторними та ад'ювантними властивостями [12]. Пептидоглікан (муреїн) — головний та невід'ємний компонент клітинної стінки фактично всіх бактерій [7]. Муреїн та його похідні муропептиди вважаються потенційними факторами вірулентності бактерій [5]. Пептидоглікани різних бактерій мають відмінні структурні особливості, однак, всі вони відсутні на поверхні еукаріотних клітин і тому є адекватною мішенню для імунної системи [4,13]. Здатність ПГ ініціювати прозапальну імунну відповідь дозволила розглядати їх як потенційні терапевтичні агенти в лікуванні онкологічних захворювань, перебіг яких, як відомо, супроводжується імуносупресивним станом [14]. ПГ різних видів бактерій відрізняються за амінокислотним складом міжланцюгових пептидних містків [8]. Метою даної роботи була оцінка реакції лімфоїдних органів мишей на введення пептидоглікану *Staphylococcus aureus* Wood 46 в нормі та при пухлинному рості.

Матеріали та методи

В дослідях використовували мишей-самиць лінії C57/Black, масою 18 - 20 г, віком 2,5 місяці розведення віварію біологічного факультету КНУ імені Тараса Шевченка.

© В. В. Позур¹, Л. М. Сківка¹, Г. П. Потебня, 2008



Тварини були розділені на 8 груп по 5 мишей в кожній: 1 — контрольні інтактні тварини; 2 — тварини, які отримали ПГ в дозі 8 мкг/г; 3 — тварини, які отримали ПГ в дозі 4 мкг/г; 4 — тварини, які отримали ПГ в дозі 2 мкг/г; 5 — контрольні тварини-пухлиноносії; 6 — тварини-пухлиноносії, які отримали ПГ в дозі 8 мкг/г; 7 — тварини-пухлиноносії, які отримали ПГ в дозі 4 мкг/г; 8 — тварини-пухлиноносії, які отримали ПГ в дозі 2 мкг/г. В якості експериментальної пухлини використовували карциному легенів Льюїса, отриману з Національного банку клітинних культур ІЕПОР імені Р.Є. Кавецького. Пухлину перещеплювали підшкірно в ділянку крижового відділу по 0,2 мл 20 % клітинної суспензії (300 тис. клітин/тварину).

В дослідях використовували ліофілізований пептидоглікан *S. aureus* Wood 46, люб'язно наданий професором Позуром В. К. ПГ отримувався за методами описаними раніше [1]. Вибір *S. aureus* Wood 46 як об'єкта досліджень мотивований тим, що клітини цього штаму не містять білка А, який широко застосовується в терапії онкологічних захворювань. Фізико-хімічний та хроматографічний аналізи показали наявність в його складі таких амінокислот та аміноцукру: аланіну, глютамінової кислоти, гліцину, лізину і глюкозаміну. ПГ погано розчинний у водних розчинах. В зв'язку з цим, для введення експериментальним тваринам використовували гомогенну суспензію ПГ, створену шляхом ультразвукової обробки протягом 1 - 5 хв. За даними електрофорезу оброблений ультразвуком ПГ містить три фракції з молекулярними масами 100, 92 і 84 кДа [3]. Використовували три дози пептидоглікану: 8 мкг/г, 4 мкг/г та 2 мкг/г. ПГ вводили одночасно з трансплантацією пухлинних клітин. Інтактним контрольним тваринам ПГ вводили також підшкірно в ділянку крижового відділу в тих самих дозах. Реакцію лімфоїдних органів (регіонарних по відношенню до місця трансплантації пухлинних клітин і введення ПГ пахових лімфовузлів, селезінок та тимусів) оцінювали за ваговими індексами, які розраховували за формулою: вага органу/загальна вага тварини, а також за відносним вмістом лімфоїдних клітин, який визначали за формулою: абсолютна кількість мононуклеарних клітин/вага органу [15]. Дослідження проводились на 33-ю добу після перещеплення експериментальної пухлини і введення ПГ.

Результати та їх обговорення

Організованою лімфоїдною структурою, яка першою залучається в імунну відповідь, є регіонарний, по відношенню до місця введення імуногену, лімфовузол. Як видно з табл. вага пахових лімфовузлів і відносний вміст у них мононуклеарних лейкоцитів у групі тварин, які отримали ПГ в найбільшій дозі (8 мкг/г), достовірно не відрізнялась від контролю. Введення ПГ в дозі 4 мкг/г призводило до зменшення ваги регіонарних лімфовузлів удвічі, порівняно з інтактним контролем при відсутності змін у кількості лімфоїдних клітин. Це може бути свідченням тривалої імунної відповіді у відсутності деструктивно-запальної реакції в тканині лімфатичних вузлів. Введення найменшої дози ПГ (2 мкг/г) призводило також до зменшення ваги регіонарних лімфовузлів в 2,5 рази, за наявності тенденції збільшення вмісту лімфоцитів порівняно з контрольними тваринами.

Сенсибілізовані антигеном клітини мігрують також до інших вторинних лімфоїдних органів, включаючи селезінку. Зростання відносного вмісту мононуклеарів у селезінці, як правило, свідчить про посилену експансію плазматичних антитілопродукувальних клітин [9].



Реакція лімфоїдних органів мишей на пептидоглікан *Staphylococcus aureus* Wood 46 в нормі і при пухлинному рості

Table

The reaction of mice lymphoid organs on peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* Wood 46 in norm and under tumor growth

Доза ПГ	Лімфовузли		Селезінки		Тимуси	
	Ваговий індекс · 10 ³	Відносна клітинність · 10 ⁴	Ваговий індекс · 10 ³	Відносна клітинність · 10 ⁴	Ваговий індекс · 10 ³	Відносна клітинність · 10 ⁴
Інтактні тварини						
Контр.	5,2 ± 0,5	0,1 ± 0,05	2,8 ± 0,3	22,0 ± 0,04	1,1 ± 0,1	0,2 ± 0,03
8 мкг/г	6,2 ± 0,8	0,2 ± 0,06	5,6 ± 0,9 ^a	30,0 ± 0,03 ^a	4,7 ± 0,3 ^a	0,3 ± 0,04 ^a
4 мкг/г	2,4 ± 0,5 ^a	0,1 ± 0,05	7,6 ± 0,8 ^a	13,0 ± 0,01 ^a	0,7 ± 0,4	1,7 ± 0,06 ^a
2 мкг/г	1,4 ± 0,3 ^a	0,2 ± 0,04 ^a	3,7 ± 0,5 ^a	32,0 ± 0,04 ^a	2,3 ± 0,8 ^a	0,4 ± 0,01 ^a
Тварини з перещепленою пухлиною						
Контр.	2,8 ± 0,7 ^a	0,1 ± 0,01	4,8 ± 0,4 ^a	53,0 ± 0,04 ^a	1,9 ± 0,3 ^a	1,1 ± 0,3 ^a
8 мкг/г	1,6 ± 0,1 ^{a,b}	0,1 ± 0,09	3,4 ± 0,8 ^b	58,0 ± 0,05 ^{a,b}	0,7 ± 0,2 ^{a,b}	0,6 ± 0,04 ^{a,b}
4 мкг/г	2,6 ± 0,7 ^a	0,2 ± 0,05 ^{a,b}	7,7 ± 1,2 ^{a,b}	50,0 ± 0,06 ^{a,b}	2,5 ± 0,5 ^a	0,8 ± 0,01 ^{a,b}
2 мкг/г	1,2 ± 0,3 ^{a,b}	0,3 ± 0,07 ^{a,b}	8,9 ± 1,2 ^{a,b}	16,0 ± 0,1 ^{a,b}	1,9 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,09 ^{a,b}

Примітка: ^a – p<0,05 достовірно в порівнянні з контрольними здоровими тваринами, ^b – p<0,05 достовірно в порівнянні з контрольними тваринами-пухлиноносіями.

Note: ^a – statistically significant p<0,05 in comparison with intact control, ^b – statistically significant p<0,05 in comparison with tumor control.

Як видно з табл. введення максимальної дози ПГ мишам без пухлин приводило до збільшення ваги селезінки в 1,5 рази, а також до помірного зростання відносного вмісту в ній лімфоїдних клітин порівняно з інтактним контролем. У тварин, які отримали ПГ у дозі 4 мкг/г, вага селезінки була майже в 2,5 рази більшою за контрольні зразки. Однак, відносний вміст лімфоїдних клітин був нижчий у порівнянні з інтактним контролем майже в 2 рази. Введення найменшої дози ПГ спричиняло незначну спленомагалію, при цьому відносний вміст лімфоїдних клітин в селезінках цих тварин був найбільшим. Ймовірно, найефективнішим для стимуляції антитілогенезу є введення ПГ у дозі 2 мкг/мл.

Одним з ключових лімфоїдних органів у розвитку імунної відповіді є тимус, який спричиняє регуляторний вплив на рівень як клітинного, так і гуморального імунітету шляхом експорту на периферію ефекторних та регуляторних клітин [10]. Відносна вага тимусу при введенні тваринам найбільшої дози ПГ, була майже в 5 разів більшою порівняно з контрольними тваринами, при незначному збільшенні

вмісту тимічних мононуклеарних лейкоцитів. Введення ПГ в дозі 4 мкг/г достовірно не впливало на вагу тимусів і спричиняло істотне збільшення вмісту лейкоцитів. Введення найменшої дози ПГ спричиняло одночасне зростання ваги і клітинності тимусів дослідних тварин.

Реакція лімфоїдних органів на ПГ у мишей на фоні пухлинного росту була дещо іншою. Вага пахових лімфатичних вузлів у мишей з пухлиною була в 2 рази меншою порівняно з контролем. Введення ПГ в максимальній дозі призводило до зменшення розмірів пахових лімфовузлів як в порівнянні з інтактним контролем, так і в порівнянні з контролем пухлини при незмінному відносному вмісті мононуклеарних клітин. Введення середньої дози препарату не позначилося на показниках лімфовузлів дослідних тварин. В групі тварин, що отримали ПГ у найменшій дозі, відносна вага лімфовузлів була найменшою, а клітинність найбільшою, як порівняно з інтактним контролем, так і порівняно з контролем пухлини. Спостерігалась чітка дозова залежність: чим менша доза ПГ, тим більший відносний вміст мононуклеарних клітин у регіонарних лімфатичних вузлах. Найменша доза ПГ спричиняла істотне (на 58 %) зменшення ваги лімфатичних вузлів при одночасному зростанні вмісту клітин у 3 рази, що, ймовірно, є свідченням тривалої імунної відповіді.

Вага селезінки у контрольних мишей-пухлиноносіїв майже вдвічі перевищувала таку у інтактних тварин, відносний вміст спленоцитів також був вдвічі більшим за контроль. Вплив ПГ на вагу селезінок мишей-пухлиноносіїв носив зворотнопропорційний дозозалежний характер: чим меншою була доза ПГ, тим більшою була відносна вага органу. Що стосується впливу на вміст клітин, то лише у мінімальній дозі (2 мкг/г) ПГ спричиняв істотне збільшення відносної їх кількості, яке сягало значень, властивих тваринам без пухлин.

Пухлинний ріст, як відомо, може супроводжуватися морфологічними змінами тимусу [6,11]. За результатами наших досліджень вага тимусу у контрольних тварин-пухлиноносіїв достовірно не відрізнялася від інтактного контролю, а відносний вміст тимоцитів був у 5,5 разів більшим. Введення ПГ в максимальній дозі спричиняло помірне зниження відносної ваги тимусів й істотного (на 50 %) зниження вмісту мононуклеарних клітин. При зменшені дози ПГ відносна вага тимусів мала тенденцію до збільшення, а вміст тимоцитів не зазнавав достовірних змін.

Таким чином, найбільш виразні позитивні зміни досліджуваних лімфоїдних органів як у тварин без пухлин, так і у мишей з карциною легені Льюїса спричиняв ПГ у мінімальній дозі (2 мкг/г). Відмінність реакції органів імунної системи на ПГ у нормі і при пухлинному рості полягала в тому, що у тварин з карциною легенів Льюїса введення препарату не мало достовірного впливу на досліджувані показники тимусу, на відміну від здорових тварин. Більш виразною у мишей-пухлиноносіїв була реакція селезінки. Слід також відмітити, що при пухлинному рості в ряді випадків прослідковувалася чітка дозова залежність впливу пептидоглікану *Staphylococcus aureus* Wood 46 на досліджувані характеристики лімфоїдних органів, тоді як у тварин без пухлини така залежність була практично відсутня.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вершигора А.Є., Аверкиев А. А., Пастер Є. У., Позур В. К., Холодна Л. С. Инфракрасные спектры некоторых фракций стафилококка // Микробиол. журн. — 1981. — № 4. — С. 482-486.



2. Позур В. В., Сківка Л. М., Потебня Г. П. Динаміка росту експериментальних пухлин у мишей під впливом аутовакцини з пептидогліканом // IV Міжнародна конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 7-10 квітня, 2008 р.): тез. доп. — "Львів", 2008. — С. 332.
3. Позур В. К., Михальський Л. А. Гетерогенність бактеріальних пептидогліканів // Укр. біохім. журн. — 1995. — № 1. — С. 96-100.
4. Позур В. К. Імунобіологічна активність бактеріальних пептидогліканів. — К.: Фітосоціоцентр, 2002. — 236 с.
5. Vonesca I. G. The role of peptidoglycan in pathogenesis // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2005. — V. 1, № 8. — P. 46-53.
6. Fu Y. *at. all.* Thymic involution and thymocyte phenotypic alterations induced by murine mammary adenocarcinomas // *J. Immunol.* — 1989. — № 12. — P. 4300-4307.
7. Jacobs-Wagner C. *Bacterial cell shape* // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2005. — V. 8, № 3. — P. 601-610.
8. Jean van Heijenoort Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial **peptidoglycan** // *Glycobiology.* — 2001. — V. 3, № 11. — P. 25-36.
9. Jeneway C. A. *at. all.* Immunology: the immune system in health & disease. — N. Y.: Garland Publishing, 2002. — 732 p.
10. Kozłowska E., Kopeć-Szlezak J. Sensitivity of mouse lymphoid and nonlymphoid organs to Silesian air pollutants // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 1997. — V. 1, № 37. — P. 10-16.
11. Mandal D., Bhattacharyya A., Lahiry L. *at. all.* Failure in peripheral immuno-surveillance due to thymic atrophy: importance of thymocyte maturation and apoptosis in adult tumor-bearer // *Life Sci.* — 2005. — V. 21, № 77. — P. 2703-2716.
12. Moreillon P., Majcherczyk P. A. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria // *Scand. J. Infect. Dis.* — 2003. — V. 9, № 35. — P. 632-641.
13. Rosenthal R. S., Dziarski R. Isolation of **peptidoglycan** and soluble **peptidoglycan** fragments // *Methods Enzymol.* — 1994. — № 235. — P. 253-285.
14. Traub S. *at. all.* MDP and other muropeptides — direct and synergistic effects on the immune system // *J. Endotoxin. Res.* — 2006. — № 12. — P. 69-85.
15. Yarilin A. A., Belyakov I. M. Cytokines in the thymus: production and biological effects // *Curr Med Chem.* — 2004. — № 11. — P. 447-464.

В. В. Позур¹, Л. М. Сківка¹, Г. П. Потебня²

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

²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Е. Кавецького НАН України, ул. Васильківська, 45, Київ-22, 03022, Україна

РЕАКЦИЯ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ НА ПЕПТИДОГЛІКАН *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 В НОРМЕ И ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

Реферат

У інтактних мишей і мишей с карциномой легкого Льюиса исследовали влияние пептидоглікана (ПГ) *Staphylococcus aureus* Wood 46 на весовые индексы лимфоидных органов и содержание в них мононуклеарных клеток. Показано, что наиболее выразительные позитивные изменения исследуемых лимфоидных органов как у животных без опухолей, так и у мишей с карциномой легких Льюиса имело введение ПГ в минимальной дозе (2 мкг/г). Отличие реакции органов иммунной системы на ПГ в норме и при опухолевом росте заключалась в том, что у животных



с карциномой легких Льюиса введение препарата не имело достоверного влияния на исследуемые показатели тимуса, в отличие от здоровых животных. Более выраженной у мышей-опухоленосителей была реакция селезенки. Следует также отметить, что при опухолевом росте в ряде случаев была видна четкая дозовая зависимость влияния пептидогликана *Staphylococcus aureus* Wood 46 на исследуемые характеристики лимфоидных органов, тогда как у животных без опухоли такая зависимость практически отсутствовала.

К л ю ч е в ы е с л о в а: пептидогликан *Staphylococcus aureus* Wood 46, карцинома легкого Льюиса, лимфоидные органы.

V. V. Pozur¹, L. M. Skivka¹, G. P. Potebnya²

¹T. Shevchenko Kyiv National University, Kyiv 03022, Ukraine, realmed@i.com.ua

²R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, 03022, Ukraine

THE REACTION OF MICE LYMPHOID ORGANS ON PEPTIDOGLYCAN OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 IN NORM AND UNDER TUMOR GROWTH

Summary

The effects of peptidoglycan (PG) of *Staphylococcus aureus* Wood 46 on the weight indexes and the cellularity of lymphoid organs in normal mice and mice with Lewis lung carcinoma were investigated. It was shown, that most immunogenic doze of PG both for intact animals, and for animals with experimental tumors was 2 µg/g though character of reaction of immune system organs on PG introduction in healthy mice and tumor bearing mice was different. Unlike healthy mice PG had no effect on thymus weight and relative amount of lymphocytes in mice with Lewis lung carcinoma. In addition in tumor bearing mice the reaction on PG administration was more significant. It is necessary to note that under the tumor growth dose-dependence of PG of *Staphylococcus aureus* Wood 46 on studied lymphoid organs was observed in the number of cases.

К е у w o r d s: peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* Wood 46, Lewis lung carcinoma, lymphoid organs.



Л. Ю. Лукачинець, С. Ю. Чундак, Н. В. Бойко

Ужгородський національний університет, вул. Підгірна, 46, Ужгород, 88000,
Україна, тел.: 8 (03122) 33 148,
e-mail: nadiya.boyko@gmail.com; lesik@uzh.ukrtel.net

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСНИХ СПОЛУК НІТРАТУ КАДМІЮ (II) З 3-,4-НІТРОБЕНЗГІДРАЗИДАМИ

Досліджено антибактеріальні властивості комплексних сполук (ди-мета-нітро-к³-О, О'О'/-біс [біс (3-бензгідрозиду-к²N', О) кадмію (II)] динітрату [Cd (3-NBA)₂NO₃] NO₃) та аква (нітрато-к²О, О') біс (4-нітробензгідрозиду-к²N², О) кадмію (II) нітрату [Cd (4-NBA)₂NO₃H₂O] NO₃) стосовно умовно патогенних мікроорганізмів – збудників нозокоміальної інфекції людини. Охарактеризовано можливість застосування зазначених сполук у якості нових хіміотерапевтичних і/чи дезінфікувальних засобів.

К л ю ч о в і с л о в а: ново-синтезовані гідрозиди карбонових кислот, антибактеріальні властивості, нозокоміальна (шпитальна) інфекція, дезінфекція.

Гідрозиди карбонових кислот (ГКК) широко застосовуються у медицині як ефективні препарати для лікування туберкульозу, гіпертонії, онкологічних захворювань тощо [1-4]. Однак, антибактеріальна ефективність комплексних сполук ГКК із іонами металів, особливо II-Б групи, сьогодні є недостатньо вивченою [5]. Відомим є, що їх токсична дія стосовно усіх біологічних об'єктів, у тому числі і мікроорганізмів, детермінується переважно типом центрального металу у комплексі, і лише незначною мірою залежить від властивостей самого ліганду. Виявлена у опортуністичних патогенів (збудників шпитальної інфекції людини) множинна стійкість до цілого ряду протимікробних засобів, у тому числі антибіотичних речовин нового покоління та до новітніх дезінфікувальних засобів [7, 12-14], ускладнює боротьбу з поширенням та домінуванням нозокоміальної інфекції у сучасній клініці.

Дана робота присвячена висвітленню результатів досліджень із встановлення антибактеріальних властивостей ново-синтезованих нами комплексних сполук кадмій (II) нітрату з гідрозидами 3-, 4-нітробензенових кислот стосовно найбільш типових представників умовно-патогенних бактерій, що зумовлюють шпитальну інфекцію людини.

Матеріали і методи

Досліджувані комплекси було синтезовано нами із гарячих спиртових розчинів, що містили 1 ммоль нітрату кадмію (II) та 1 ммоль ліганду, тобто гідрозиду 3- чи 4-нітробензойної кислоти відповідно (3-NBA, 4-NBA). Коротко: [Cd (Гм-НБК)₂NO₃]_xNO₃ одержували шляхом додавання до гарячого спиртового розчину, що містив 1 ммоль кадмійнітрату, гарячого розчину мета-нітробензгідрозиду (Гм-НБК)



в етанолі. Осад, що утворився через 24 години внаслідок повного охолодження новоутвореного розчину, у ваговому співвідношенні становив близько 62 % від теоретично обрахованого виходу продукту і був представлений дрібними кристалами жовтуватого кольору. Нова сполука добре розчиняється у диметилформаміді (ДМФА) та диметилсульфоксиді (ДМСО), погано – у воді і є практично нерозчинною у інших органічних розчинниках. Температура плавлення ($T_{пл.}$) $[Cd(\text{Гм-НБК})_2\text{NO}_3]\times\text{NO}_3$ рівна 150 °С. Аналогічно $[Cd(\text{Гп-НБК})_2\text{H}_2\text{ONO}_3]\times\text{NO}_3$ одержували шляхом додавання до гарячого спиртового розчину, що містив 1 ммоль кадмійнітрату, 1 ммоль гарячого розчину пара-нітробензгідразиду (Гп-НБК) в етанолі. Осад, що утворився через добу після повного охолодження розчину у вигляді прозорих дрібних кристалів жовтого кольору, також був добре розчинним у ДМФА та ДМСО, погано розчинним у воді, і зовсім нерозчинним у інших органічних розчинниках. $T_{пл.}$ $[Cd(\text{Гп-НБК})_2\text{H}_2\text{ONO}_3]\times\text{NO}_3$ рівна 165 ± 5 °С, а його вихід становив близько 60 відсотків від теоретично обрахованого виходу продукту. Склад ново-синтезованих речовин було встановлено за допомогою хімічного аналізу, а будову за методами ІЧ-спектрометрії та рентгенівської дифракції [10, 11]. Координаційному оточенню Cd^{2+} у обох випадках відповідає форма дуже деформованого октаедру.

На рисунку 1 наведено структурне зображення комплексних сполук кадмійнітрату з вказаними лігандами.

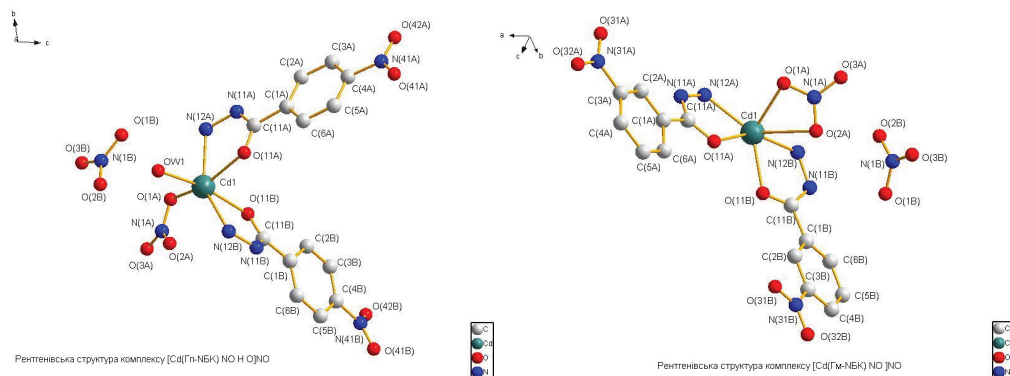


Рис. 1. Структурне зображення комплексних сполук кадмійнітрату з гідразидами 3-, 4-нітробензових кислот.

Fig. 1. The structural image of the cadmium nitrate complex compounds with hydrazides of the 3-, 4- nitro benzoic acids.

Біологічну активність досліджуваних комплексів кадмій (II) нітрату з гідразидами 3-, 4-нітробензових кислот визначали стосовно ряду штамів мікроорганізмів, ізольованих із різних відділень обласної клінічної лікарні (ОКЛ) м. Ужгорода, а саме: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *MRSA*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*. Для уточнення спектру антибактеріальних властивостей згаданих ново-синтезованих сполук використовували також деякі філогенетично відмінні музейні види бактерій, зокрема: *Sarcina flava*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* і *Salmonella typhimurium*.



Антибактеріальні властивості досліджуваних сполук стосовно зазначених тест-культур мікроорганізмів встановлювали *in vitro* — методом паперових дисків на твердих поживних середовищах, вимірюючи зони затримки росту бактерій та визначаючи бактерицидну (зона затримки росту більше 20 мм протягом трьох діб) та бактериостатичну дію (зона затримки росту від 10 до 20 мм, можливий повторний ріст бактерій через 48 і/чи 72 год.).

МПК досліджуваних комплексів визначали класичним методом серійних розведень. В якості розчинника комплексних сполук використовували ДМСО.

Для спрямованого відбору видів бактерій — потенційних збудників нозокоміальної інфекції — та спрощення процедури їх наступної ідентифікації для висіву матеріалу обстежень використовували селективні (хромогенні) поживні середовища нового покоління виробництва bioMerieux, France: SM ID 2 (*Salmonella*), CPS ID 3 (*E. coli*, *Proteus*, *Enterococci*), *S. aureus* ID, MRSA ID, SMAC CT agar (*E. coli* O157H7), UriSelect agar тощо. Ідентифікацію усіх збудників шпитальної інфекції проводили шляхом поєднання вихідних рутинних тестів (мікроскопія, фарбування по Граму, КОН, оксидазний, плазмокоагулазна, лецитиназна, гемолітична активність тощо) із наступним застосуванням автоматизованих та пів-автоматизованих методів типування бактеріальних культур: біохімічні тест-системи: API, VITEK2 [15]. Генетичну спорідненість одержаних клінічних ізолятів та, відповідно, їх причетність до виникнення нозокоміальної інфекції встановлювали за допомогою ПЛР, ПЛР повторної екстра-генетичної паліндромної послідовності та ДНК-секвенування. Використовували наступні праймери: 1) для визначення генів резистентності до ванкоміцину: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*; 2) для визначення наявності генів β-лактамаз розширеного спектру (Extended Spectrum Beta-Lactamase, ESBL) у грам-негативних представників: SHV, TEM, CTX [6, 9].

Результати та їх обговорення

В результаті 3-х періодичних бактеріологічних обстежень різних відділень ОКЛ нами всього було ізольовано 147 бактеріальних культур із різних джерел. Проведений аналіз генетичної спорідненості одержаних бактеріальних ізолятів показав, що потенційними збудниками нозокоміальної інфекції виявились: у гастро-ентерологічному відділенні — *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*; у відділенні госпітальної хірургії — *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*; у ЛОР відділенні — штами *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* і MRSA [8]. Як приклад, результати визначення наявності ESBL генів, а саме SHV, TEM, CTX, у множинно-резистентного штаму *Enterobacter cloacae* показані на рисунку 2.

Результати досліджень біологічної активності комплексних сполук нітрату кадмію з 3-, 4-нітробензгідразидами показані на рисунку 3, а і б. Було доведено (необхідні контролі, на рис. 3 показані штрихованими зонами), що чисті ліганди (3-NBA, 4-NBA) не виявляють токсичну дію по відношенню до тестованих нами штамів бактерій. Аналогічно, жодної інгібувальної здатності не було виявлено у диметилсульфоксиду, який використовували для приготування робочих розчинів комплексних сполук.





Рис. 2. ESB test: попереднє визначення наявності генів множинної резистентності до антибіотиків у клінічного штаму *Enterobacter cloacae*

Fig. 2. ESB-test: the preliminary detection of the presence of the genes responsible for multi resistance for the antibiotics in *Enterobacter cloacae* clinical strain

Як видно із даних, представлених на рисунку 3, досліджувані ново-синтезовані комплекси демонстрували виразну бактерицидну дію до: *Sarcina flava*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* (зони затримки росту для даних штамів перевищували 20 мм) та бактериостатичну дію стосовно клінічних культур *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *MRSA*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* (зони затримки росту від 10 мм до 20 мм).

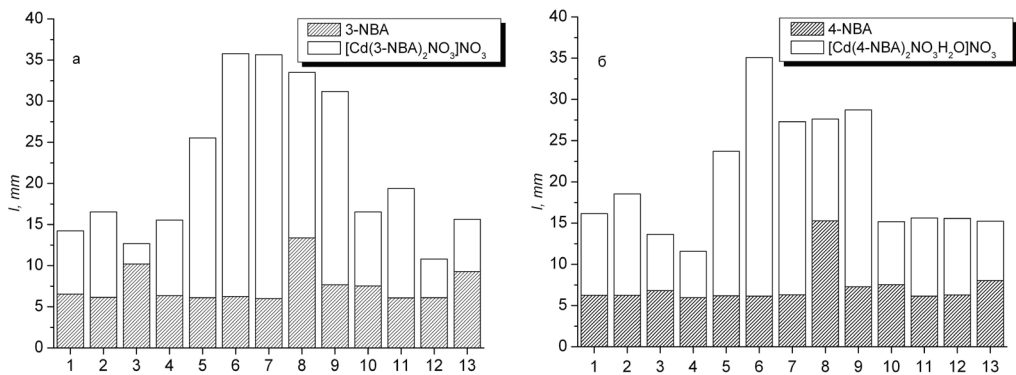


Рис. 3. Спектр антибактеріальної дії 3-NBA і [Cd (3-NBA)₂NO₃] NO₃ (а) та 4-NBA і [Cd (4-NBA)₂NO₃H₂O] NO₃ (б) на мікроорганізми:

1 – *Escherichia coli*, 2 – *Staphylococcus aureus*, 3 – *Salmonella typhimurium*, 4 – *Klebsiella pneumoniae*, 5 – *Acinetobacter baumannii*, 6 – *Sarcina flava*, 7 – *Pseudomonas aeruginosa*, 8 – *Streptococcus pneumoniae*, 9 – *Bacillus subtilis*, 10 – *MRSA*, 11 – *Enterobacter cloacae*, 12 – *Proteus mirabilis*, 13 – *Klebsiella oxytoca*;
де I – інгібувальна активність.

Fig. 3. The spectrum of the antibacterial properties of the 3-NBA and [Cd (3-NBA)₂NO₃] NO₃ (a) or 4-NBA and [Cd (4-NBA)₂NO₃H₂O] NO₃ (b) on the following microorganisms:

1 – *Escherichia coli*, 2 – *Staphylococcus aureus*, 3 – *Salmonella typhimurium*, 4 – *Klebsiella pneumoniae*, 5 – *Acinetobacter baumannii*, 6 – *Sarcina flava*, 7 – *Pseudomonas aeruginosa*, 8 – *Streptococcus pneumoniae*, 9 – *Bacillus subtilis*, 10 – *MRSA*, 11 – *Enterobacter cloacae*, 12 – *Proteus mirabilis*, 13 – *Klebsiella oxytoca*;
where I – is inhibitory effectiveness.

Обидва синтезовані нами комплекси виявляли однакову дію щодо вказаних штамів бактерій, що лише підтверджує детермінованість біологічних властивостей зазначених комплексів їх центральним металом.

Що стосується з'ясування ефективних і мінімально-пригнічувальних концентрацій ново-синтезованих сполук, слід відмітити, що у випадку їх застосування супроти таких опортуністичних патогенів, як *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* та для *Bacillus subtilis* вони виявились досить значними — до 50 мкг/мл; тоді як бактериостатичну дію зумовлювали дещо нижчі дози — від 10 до 25 мкг/мл (у залежності від виду тест-культур) і збільшення останніх не завжди призводило до повного знищення або більш суттєвої затримки росту тестованих штамів.

Визначення гострої та хронічної токсичності *in vivo* на мишах та інших адекватних моделях дасть нам змогу прийти до висновку чи дані сполуки в принципі можуть розглядатись як перспективні хіміотерапевтичні засоби бодай з метою їх призначення для місцевого (локального) застосування. Сьогодні ж очевидним є, що комплексні сполуки: ди-мета-нітро- κ^3 -O, O/O//-біс [біс (3-бензгідразидук 2 N', O) кадмію (II)] динітрату ([Cd (3-NBA) $_2$ NO $_3$] NO $_3$) та аква (нітрато- κ^2 O, O/) біс (4-нітробензгідразиду- κ^2 N 2 , O) кадмію (II) нітрату ([Cd (4-NBA) $_2$ NO $_3$ H $_2$ O] NO $_3$) можуть бути запропоновані насамперед в медичній та ветеринарній практиці як ефективні дезінфікуючі засоби.

ЛІТЕРАТУРА

1. Авакян А. Х. Новые молекулярные критерии оценки токсического действия производных гидразина. Активные формы кислорода как ключевые агенты в механизме токсичности // Фармакол. и токсикол. — 1990. — Т. 53., № 1. — С.70 — 73.
2. Альберт А. Избирательная токсичность: Пер. с англ. — М. — 1971. — С. 431.
3. Джарадат Н. А. Синтез потенційних протитуберкульозних засобів на основі гідразидів 1-*R*-2-оксо-4-гідроксініолін-3-карбонових кислот: Автореферат дис. канд. фарм. наук, Харків: 2000. — 28 с.
4. Зеленин К. Н. Физиологически активные комплексы гидразонов // СОЖ. Серия: Химия. — 1996. — № 12. — С. 41 — 46.
5. Обозова Л. А., Крымова Н. М. Устойчивость в водных растворах и биологическая активность комплексов изоникотиноилгидразина и его ацетилпроизводного с Cu (II), Ni (II) и Co (II) // Хим.-фарм. журн. — 1998. — Т. XXII, № 1. — С. 27 — 32.
6. *Antimicrobial Resistance in Bacteria*. Editor: Amabile-Cuevas C. F. Horizon Scientific Press. — 2006. — 201 p.
7. Bean D. C., Krahe D., Wareham D. W. Antimicrobial resistance in community and nosocomial *Escherichia coli* urinary tract isolates, London 2005 — 2006 // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. — 2008. — № 7. — P. 13 — 17.
8. Boyko N. V., Petrov V. O., Szaby J., Kulja A., Koval H. M., Kalapos I. Nosocomial infections in clinical units from Ukrainian-Hungarian transborder area: current state, ecological aspects and novel strategy for its prevention // MicroCAD 2008. Human Health. ISBN 978-963-661-829-2. P. 7 — 14.
9. Calbo E., Romanó V., Xercavins M., Gomez L., Vidal C. G., Quintana S., Vila J., Garau J. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases // J. Antimicrob. Chemother. — 2006. — V. 57. — P. 780-783.
10. Chundak S. Yu., Lukachinec L. Yu., Daszkiewicz M. Aqua (nitrato- κ^2 O, O/) bis (4-nitrobenzohydrazide- κ^2 N 2 , O) cadmium (II) nitrate // Acta Cryst. — 2007. — V. 63, P. 2815-2816.
11. Chundak S. Yu., Lukachinec L. Yu., Daszkiewicz M. Di-*m*-nitrato- κ^3 O: O/O//-bis [bis (3-nitrobenzohydrazide- κ^2 N', O) cadmium (II)] dinitrate // Acta Cryst. — 2007. — V. 65. P. 2893.



12. Falagas M. E., Koletsis P. K., Bliziotis I. A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* // J. Med. Microbiol. — 2006. — V. 55, № 12. — P. 1619 — 1629.
13. Harbarth S., Fankhauser C., Schrenzel J., Christenson J., Gervaz P., Bandiera-Clerc C., Renzi G., Vernaz N., Sax H., Pittet D. Hospital admission and nosocomial infection in surgical patients // JAMA. — 2008. — V. 299. — P. 1149 — 1157.
14. Kohlenberg A., Schwab F., Geffers C., Behnke M., Røden H., Gastmeier P. Time-trends for Gram-negative and multidrug-resistant Gram-positive bacteria associated with nosocomial infections in German intensive care units between 2000 and 2005 // Clin. Microbiol. Inf. — 2008. — V. 14, № 1. P. 93-96.
15. Robinson A., Mccarter Y. S., Tetreault J. Comparison of Crystal Enteric/Nonfermenter System, API 20E System, and Vitek Automicrobic System for Identification of Gram-Negative Bacilli // J. Clin. Microbiol. — 1995. — V. 33, № 2. P. 364-370.

Робота виконана за підтримки грантів ДФФД № Ф 20/451-2007 (0107U008933), М/220-2007 та ДБ 632 п.

Л. Ю. Лукачинец, С. Ю. Чундак, Н. В. Бойко

Ужгородский национальный университет, ул. Подгорная, 46, Ужгород, 88000,
Украина, тел.: 8 (03122) 33 148,
e-mail: nadiya.boiko@gmail.com, lesik@uzh.ukrtel.net

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНЫХ ВЕЩЕСТВ НИТРАТА КАДМИЯ (II) С 3-, 4-НИТРОБЕНЗГИДРАЗИДАМИ

Реферат

Исследовано антибактериальные свойства комплексных веществ (ди-мета-нитро-к³-О, О'/О''-бис [бис (3-бензгидразида-к²N', О) кадмия (II)] бинитрата ([Cd (3-NBA)₂NO₃] NO₃) и аква (нитрато-к²О, О') бис (4-нитробензгидразида-к²N², О) кадмия (II) нитрата ([Cd (4-NBA)₂NO₃H₂O] NO₃) к условно-патогенным бактериям — возбудителям нозокомиальной инфекции человека. Охарактеризованы возможности применения указанных веществ в качестве новых химиотерапевтических и/или дезинфицирующих средств.

К л ю ч е в ы е с л о в а: ново-синтезированные гидразиды карбоновых кислот, антибактериальные свойства, нозокомиальная (госпитальная) инфекция, дезинфекция.



L. Yu. Lukachinets, S. Yu. Chundak, N. V. Boyko

Uzhhorod national University, 46, Pidgirna St., Uzhhorod, 88000, Ukraine,
tel.: 8 (03122) 33 148, e-mail: nadiya.boyko@gmail.com, lesik@uzh.ukrtel.net

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE COMPLEX COMPOUNDS
OF NITRATE CADMIUM (II) WITH THE
3-, 4- NITROBENZOHYDRAZIDES**

Summary

The results of the antibacterial activity of di-*m*-nitrate-*k*³O: O/O//-bis [bis (3-nitrobenzohydrazide-*k*²N', O) cadmium (II)] dinitrate and aqua (nitrate-*k*²O, O/) bis (4-nitrobenzohydrazide-*k*²N², O) cadmium (II) nitrate relatively to opportunistic pathogenic bacteria – the agents of human nosocomial infections have been investigated. The prosperity of the practical usage of the given compounds as new chemotherapeutical and/or disinfecting remedies are discussed and characterized.

К e y w o r d s: new-synthesized hydrazides of the carbonic acids, antibacterial properties, nosocomial (hospital) infection diseases, disinfection.



**Н. С. Водзінська, Т. О. Філіпова, Б. М. Галкін, Ю. В. Ішков,
Г. М. Кириченко**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 63 57 61,
e-mail: nsvod@ukr.net

ІНАКТИВАЦІЯ СТАФИЛОКОКОВОГО БАКТЕРІОФАГА В ПРИСУТНОСТІ СИНТЕТИЧНИХ ПОРФІРИНІВ

*У модельній системі “бактеріофаг – бактерія хазяїн” вивчений вплив синтетичних порфіринів на інфекційні властивості стафілококового фага. Показано, що у темнових умовах антифагову активність чинять металокомплекси тетрахінолінилпорфірину з цинком і вісмутом в концентрації 10 мкМ. Вісмутові комплекси протопорфірину IX і тетрапіридилпорфірину знижують інфекційність бактеріофага за усіх досліджених концентрацій (0,1; 1 і 10 мкМ). Після фотоактивації всі сполуки на 30-70 % пригнічували здатність бактеріофага лізувати клітини *S. aureus*. Інактивація стафілококового бактеріофага у темнових умовах спостерігалася через 24 години після додавання порфіринів, а за фотоактивації – через 20 хвилин.*

К л ю ч о в і с л о в а: стафілококовий бактеріофаг, синтетичні порфірини, антифагова активність, фотоактивація.

Фотодинамічна терапія (ФДТ), основним принципом якої є використання фотосенсибілізаторів, активованих світлом, являється ефективним методом лікування онкологічних захворювань [5,11]. Одними з найбільш ефективних фотосенсибілізаторів на даний момент є порфірини та їх похідні. Останнім часом показано, що вони є не тільки ефективними протипухлинними агентами, але й проявляють фотодинамічну та темнову активність щодо патогенних та умовно-патогенних бактерій. Одним з перспективних напрямків використання порфіринів може стати інактивація вірусів та дезінфекція крові та її компонентів [9-13].

Незважаючи на успішне використання ФДТ механізми вірусної фотоінактивації та взаємодії вірусів з фотосенсибілізаторами все ще активно вивчаються [6,7,13]. Вважають, що віруси, які мають суперкапсид можуть бути інактивовані внаслідок пошкоджень, спричинених фотодинамічними реакціями в їх протеїнових молекулах [5]. Щодо вірусів, які не мають суперкапсиду, є припущення, що їх інактивація в присутності порфіринів обумовлена взаємодією останніх з нуклеїновими кислотами [6,8]. В останній час при вивченні антивірусних властивостей і механізмів дії нових сполук широко використовують бактеріофаги, які слугують моделлю патогенних ДНК вірусів людини [1,4]. Крім того, знешкодження саме бактеріофагів, що заражують стартерні культури бактерій, має значення для виробництва.

Метою даної роботи було вивчення здатності нових синтетичних порфіринів викликати фотоіндуковану та темнову інактивацію стафілококового бактеріофага.



Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження були синтетичні порфірини, а саме вільна основа хінолінілпорфірину та її комплекси із цинком, оловом та вісмутом, а також вісмутові комплекси протопорфірину IX та тетрапіридилпорфірину, синтезовані в ПНДЛ-5 Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. Антифагова дія досліджуваних сполук перевірялася у модельній системі стафілокок – полівалентний стафілококовий бактеріофаг. Штам *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 отриманий з музею кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету. Зберігання культури *S. aureus* проводили на поверхні скошеного м'ясо-пептонного агару при температурі 4 °С.

Концентрування фага проводили за методом Ямомото [14]. Отриману суспензію зберігали у холодильнику.

Для визначення інфекційного титру бактеріофага використовували метод титрування за Грація [3].

Для визначення темного впливу порфіринів фагову суспензію розливали у стерильні пробірки по 1 мл з розведення, при якому бактеріофаг утворював на бактеріальному газоні окремі негативні колонії. Усі досліджувані сполуки розчиняли у дистильованій воді і додавали у пробірки з бактеріофагом до кінцевих концентрацій 0,1; 1 та 10 мкМ. Після цього пробірки інкубували у холодильнику при температурі 4 °С протягом 24 годин.

Після закінчення терміну інкубації проводили титрування бактеріофага методом подвійних агарових шарів [3]. Кількість паралелей для кожного варіанту дорівнювала 3. За контроль правила фагова суспензія без додавання досліджуваних речовин. Для контролю росту культури у поверхневий шар агару вносили тільки *S. aureus*, а для визначення можливого впливу досліджуваних речовин на формування бактеріального газону – культуру бактерії і розчини порфіринів у досліджуваних концентраціях.

Облік результатів проводили через 24 години, підраховуючи кількість негативних колоній на бактеріальному газоні у досліді та контролі.

Антифагову активність (А) виражали у відсотках інактивації, які підраховували за формулою:

$$A = (1 - N_0/N_k) \cdot 100 \%,$$

де N_0 – кількість негативних колоній у досліді, N_k – кількість негативних колоній у контролі.

Всі експерименти проводили у трьох повторях.

Для визначення фотоіндукованого впливу порфіринів на бактеріофаг фагову суспензію одразу ж після додавання сполук піддавали опроміненню за допомогою лампи розжарювання денного світла потужністю 500 Вт протягом 20 хв. Інтенсивність опромінення складала 40 J/см² [9].

Одразу ж після опромінення проводили титрування бактеріофага за методом подвійних агарових шарів. Кількість повторів та оцінка результатів аналогічні попередній методиці.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного та кореляційного аналізу. Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel [2].



Результати та їх обговорення

При вивченні темної активності досліджуваних сполук виявилося, що найбільшу активність у темних умовах проявляє вісмутовий комплекс тетрапіридилпорфірину. Так, за присутності даної речовини у концентрації 0,1 мкМ антивірусна активність складала 34 %, 1 мкМ – 22 %, 10 мкМ – 74 % (рис. 1).

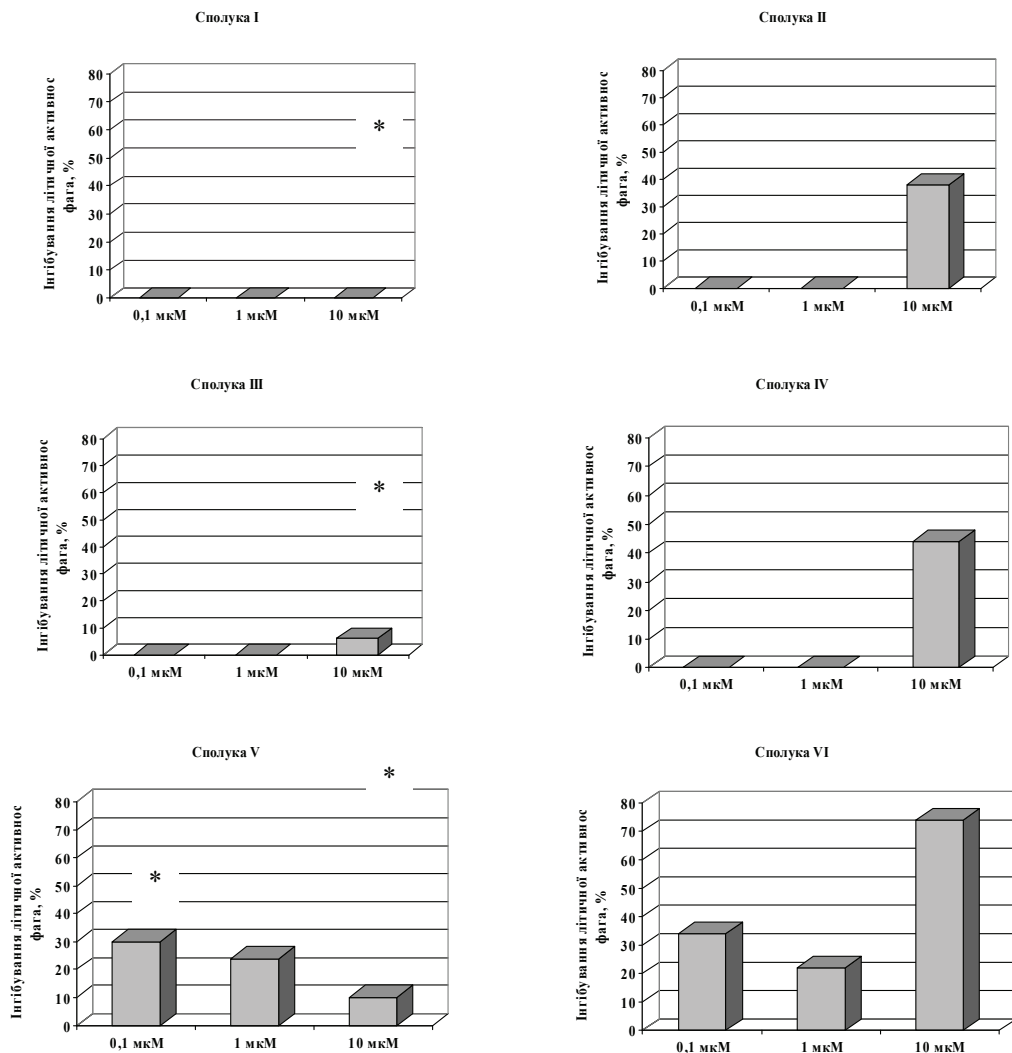


Рис. 1. Антифагова активність досліджуваних сполук за темних умов

Сполуки: I – вільна основа хінолінілпорфірину, II – цинковий комплекс хінолінілпорфірину, III – олов'яний комплекс хінолінілпорфірину, IV – вісмутовий комплекс хінолінілпорфірину, V – вісмутовий комплекс протопорфірину IX, VI – вісмутовий комплекс тетрапіридилпорфірину.

* – різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Fig. 1. Antiphage activity of studied compounds under the dark condition
 Compounds: I – free base of quinolinilporphyrin, II – quinolinilporphyrin zinc complex, III – quinolinilporphyrin tin complex, IV – quinolinilporphyrin bismuth complex, V – protoporphyrin IX bismuth complex, VI – tetrapyrroldiporphyrin bismuth complexes



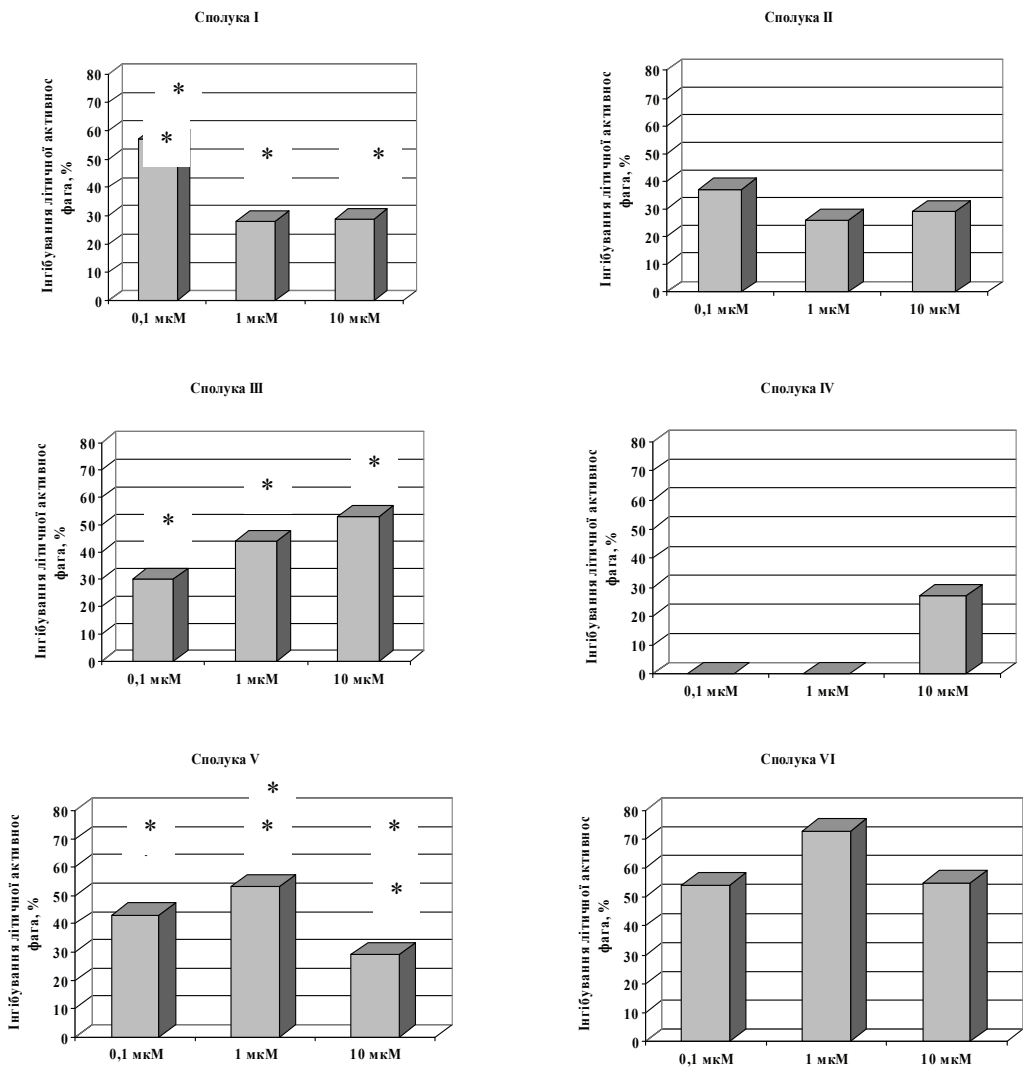


Рис. 2. Антифагова активність досліджуваних сполук після фотоактивації

Сполуки: I – вільна основа хінолінілпорфірину, II – цинковий комплекс хінолінілпорфірину, III – олов'яний комплекс хінолінілпорфірину, IV – вісмутівий комплекс хінолінілпорфірину, V – вісмутівий комплекс протопорфірину IX, VI – вісмутівий комплекс тетрапіридилпорфірину. * – різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Fig 2. Antiphage activity of studied compounds after fotoactivation

Compounds: I – free base of quinolinilporphyrin, II – quinolinilporphyrin zinc complex, III – quinolinilporphyrin tin complex, IV – quinolinilporphyrin bismuth complex, V – protoporphyrin IX bismuth complex, VI – tetrapyrrodidporphyrin bismuth complexes

Концентрація 10 мкМ виявилася також ефективною для вісмутowego, цинкового та олов'яного комплексів хінолінілпорфірину, де інактивація вірусу складала 44 %, 38 % та 6 %, відповідно, тоді як інші концентрації цих сполук не впливали на активність вірусу.

Вільна основа хінолінілпорфірину у досліджуваних концентраціях не призводила до зниження інфекційності стафілококового бактеріофага. У присутності вісмутowego комплексу протопорфірину IX спостерігали зворотню залежність активності сполуки від її концентрації. Так, за найменшої концентрації цієї сполуки антивірусна активність складала 30 %, тоді як при концентраціях 1 мкМ та 10 мкМ — 24 % та 10 % відповідно (рис. 1).

Вивчення фотодинамічної активності досліджуваних сполук показало, що серед досліджених хінолінілпорфіринів максимальну інгібуючу дію — 57 % — спостерігали при опроміненні бактеріофага у присутності 0,1 мкМ вільної основи хінолінілпорфірину. Фотоінактивація фагу у присутності 1 мкМ та 10 мкМ цієї сполуки складала 28 % та 29 % відповідно (рис. 2).

Така зворотня залежність активності сполуки від її концентрації спостерігалася також при опроміненні у присутності цинкового комплексу хінолінілпорфірину. Так, за найменшої концентрації цієї сполуки фотоінактивація складала 37 %, тоді як при концентраціях 1 мкМ та 10 мкМ — 26 % та 29 %, відповідно. Опромінення у присутності 10 мкМ олов'яного комплексу хінолінілпорфірину знижувало інфекційність фагових часток на 53 %. Антифагова дія цього порфірину за концентрації 1 мкМ складала 44 %, а за концентрації 0,1 мкМ — 30 %. Отже, залежність між активністю та концентрацією сполуки була прямою (рис. 2).

Для вісмутových комплексів порфіринів найбільш ефективною виявилася концентрація у 1 мкМ, при якій антифагова активність складала 53 % для вісмутowego комплексу протопорфірину IX та 73 % для вісмутowego комплексу тетрапіридилпорфірину. За присутності інших концентрацій цих сполук фотоінактивація фага була у межах 29 - 45 % та 54 - 55 %, відповідно. Вісмутівий комплекс хінолінілпорфірину проявляв фотодинамічну дію тільки у концентрації 10 мкМ, за якої інфекційність фагових часток знижувалася на 27 % (рис.2).

Усі вивчені порфірини у досліджених концентраціях не впливали на формування бактеріального газону стафілококом.

Таким чином, досліджені порфірини здатні впливати на інфекційність стафілококового бактеріофагу як в темнових умовах, так і при опроміненні. Більш ефективною була інактивація фага в умовах фотоактивації. Вона спостерігалася вже через 20 хвилин у присутності не тільки металокомплексів, але і вільної основи. Слід відмітити, що, на відміну від існуючих в літературі даних про темнову ефективність лише асиметрично заміщених порфіринів [6,7], у нашій роботі виявлена висока антифагова активність вісмутových комплексів симетрично заміщених синтетичних аналогів і протопорфірину IX. Це свідчить про доцільність подальшого вивчення антивірусних властивостей порфіринів, а також механізмів їх взаємодії з бактеріофагами, що мають різну будову.



ЛІТЕРАТУРА

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. — М.: Мир, 2002. — 589 с.
2. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 260 с.
3. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике: Пер. с англ. — М.: Мир, 1976. — 436 с.
4. *Bacteriophages: biology and applications* / Ed. by Elizabeth Kutter, Alexander Sulakvelidze. — CRC Press, Inc. Boca Raton, London New York Washington, 2005. — 470 p.
5. Ben-Hur R., Hoeben C., Van Ormondt H., Dubbelman T. M., Van Steveninck J. Photodynamic inactivation of retroviruses by phthalocyanines: the effects of sulphonation, metal ligand and fluoride // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* — 1992. — V. 13. — P. 145–152.
6. Egyeki M., Turyczy G., Majer Zs., Tyth K., Fekete A., Maillard P., Csik G. Photosensitized inactivation of T7 Phage as surrogate of non-enveloped DNA viruses. Efficiency and mechanism of action // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2003. — V. 1624. — P. 115-124.
7. Gbbor F., Szolnoki, J., Tyth K., Fekete A., Maillard P., Csik G. Photo-induced inactivation of T7 phage sensitized by symmetrically and asymmetrically substituted tetraphenyl porphyrin: Comparison of efficiency and mechanism of action // *Photochem. Photobiol.* — 2001. — V. 73. — P. 304-311.
8. Kasturi C., Platz M. S. Inactivation of lambda phage with 658 nm light using a DNA binding porphyrin sensitizer // *Photochem. Photobiol.* — 1992. — V. 56. — P. 427-429.
9. Matthews J. L., Sogandares-Bernal F., Judy M., Gulliya K., Newman J., Chanh T., Marengo-Rowe A. Inactivation of viruses with photoactive compounds. — *Blood Cells.* — 1992. — V. 18. — P. 75–89.
10. Smetana Z., Mendelson E., Manor J., van-Lier J. E., Ben-Hur E., Salzberg S., Malik Z. Photodynamic inactivation of herpes viruses with phthalocyanine derivatives // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* — 1994. — V. 22. — P. 37–43.
11. Trannoy L. L., Lagerberg J. W. M., Dubbelman T. M. A. R., Schuitmaker H. J., Brand A. Positively charged Porphyrins: a new series of photosensitizers for sterilization of red blood cell concentrates // *Transfusion.* — 2004. — V. 44. — P. 231-239.
12. Vyas G. N. Inactivation and removal of blood-borne viruses // *Transfusion.* — 1995. — V. 35. — P. 367– 370.
13. Wainwright M. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy // *Int. J. Antimicrob. Agents.* — 2003. — V. 21. — P. 510– 520.
14. Yamamoto K. R., Alberts B. M., Benzinger R., Hawthorne L., Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification // *Journal of Virology.* — 1970. — V. 40. — P. 734-744.

Н. С. Водзинская, Т. О. Филиппова, Б. Н. Галкин, Ю. В. Ишков, А. М. Кириченко

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 63 57 61,
e-mail: nsvod@ukr.net

ИНАКТИВАЦИЯ СТАФИЛОКОККОВОГО БАКТЕРИОФАГА В ПРИСУТСТВИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОРФИРИНОВ

Реферат

В модельной системе “бактериофаг—бактерия хозяин” изучено влияние синтетических порфиринов на инфекционные свойства стафилококкового фага. Показано, что в темновых условиях антифаговую активность оказывают металлокомплексы тетрахинолинпорфирина с цинком и висмутом в концентрации 10 мкМ. Висмутовые комплексы протопорфирина IX и тетрапиридилпорфирина снижают инфекционность бактериофага при всех изученных концентрациях (0,1, 1 и 10 мкМ). После фотоактивации все изученные соединения на 30 - 70 % подавляли способность бактериофага лизировать клетки *S. aureus*. Инактивация стафилококкового бактериофага в темновых условиях наблюдалась через 24 часа после внесения порфиринов в среду инкубации, а при фотоактивации — через 20 минут.

К л ю ч е в ы е с л о в а: стафилококковый бактериофаг, синтетические порфирины, антифаговая активность, фотоактивация.

N. S. Vodzinska, T. O. Filipova, B. M. Galkin, Yu. V. Ishkov, G. M. Kirichenko

Odesa Mechnykov National University
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: 8 (0482) 63 57 61,
e-mail: nsvod@ukr.net

STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGE INACTIVATION IN THE PRESENCE OF SYNTHETIC PORPHYRINS

Summary

Synthetic porphyrin influence on the staphylococcal bacteriophage infectious ability has been studied in the bacteriophage — host bacterium model system.

There has been shown that 10 мкМ of zinc and bismuth tetraquinolylporphyrin complexes are characterized by antiphage activity under the dark conditions. The studied (0,1, 1 и 10 мкМ) concentrations of protoporphyrin IX and tetrapyritylporphyrin bismuth complexes decreased the bacteriophage infectious ability. After photoactivation the bacteriophage ability of *S. aureus* cell lysis was suppressed by all compounds on 30 - 70 %. Under the dark conditions staphylococcal bacteriophage inactivation has been observed in 24 hours after porphyrin inoculation in the incubation medium, but in the presence of light activation — in 20 min.

К e y w o r d s: staphylococcal bacteriophage, synthetic porphyrins, antiphage activity, photoactivation.



У. Я. Стамбульська, В.І. Лушчак

Прикарпатський національний університет
імені В. Стефаника, вул. Шевченка, 57, Івано-Франківськ, 76025, Україна,
тел.: 8 (03422) 714 683, e-mail: lushchak@pu.if.ua

ВПЛИВ БАКТЕРІЙ РОДУ *RHIZOBIUM* НА КОНЦЕНТРАЦІЮ ПІГМЕНТІВ І КРОХМАЛЮ У РОСЛИН ГОРОХУ

*Вивчено вплив інокуляції бульбочковими бактеріями роду *Rhizobium* на концентрацію пігментів і крохмалю у рослин гороху посівного – *Pisum sativum* L. На початкових етапах онтогенезу гороху концентрація хлорофілу а і антоціанів була більшою, порівняно з контролем у всіх інокульованих бактеріями рослин. Обробка місцевими штамми RRL7, RRL8, RRL11 і референтним штамом *Rhizobium leguminosarum* 245a не впливала на концентрацію каротиноїдів у листках протягом всього періоду онтогенезу рослин гороху. Концентрація крохмалю у фазі 4-5 листків в рослинах *Pisum sativum* L., інокульованих бактеріями штамів RRL8, RRL11 та 245a, була нижчою, порівняно з контролем.*

Ключові слова: бульбочкові бактерії, горох посівний, пігменти, крохмаль.

У симбіозі з бульбочковими бактеріями при сприятливих умовах бобові рослини здатні засвоювати атмосферний азот [7]. Азот, нагромаджений у рослинах бобово-ризобіальними системами, розглядається як потужний фактор підвищення родючості ґрунту, заощадження мінеральних азотних добрив, зменшення забруднення навколишнього середовища шкідливими сполуками [3]. У бобових рослин існує тісний взаємозв'язок між процесами фотосинтезу і азотфіксації. Від азотного живлення залежить вміст пігментів у листку, перш за все, хлорофілу, а також каротиноїдів [5]. На даний час проводиться інтенсивний пошук нових високоефективних штамів азотфіксуючих бактерій, які можуть забезпечити потужну фіксацію азоту, сприяти прискоренню процесів фотосинтезу, що, в свою чергу, призведе до збільшення врожаю бобових культур [6, 7, 9].

Метою роботи було вивчення впливу бульбочкових бактерій гороху, виділених на території Івано-Франківської області, на концентрацію пігментів і крохмалю в листках *Pisum sativum* L.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були швидкорослі бульбочкові бактерії *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* штамів RRL7, RRL8, RRL9 і RRL11, ізольовані з рослин гороху посівного на території Івано-Франківської області. Для порівняння ефективності місцевих штамів використовували високоефективний штам *Rhizobium leguminosarum* 245a, отриманий з колекції Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного.



Бактерії вирощували при 28 °С на шейкері (120 коливань за хвилину) в рідкому живильному середовищі такого складу (г/л): глюкоза — 10,0; K_2HPO_4 — 0,5; MgSO_4 — 0,2; NaCl — 0,1; CaCO_3 — 3,0; дріжджова вода (рН 6,8) — 100 мл [8].

Польовий експеримент був проведений на базі дендропарку „Дружба” Прикарпатського національного університету імені В. Стефаника (м. Івано-Франківськ) на дерново-підзолистих ґрунтах. Стерилізоване насіння гороху сорту Альфа обробляли суспензією різних штамів бульбочкових бактерій і висаджували на випадково розташовані ділянки (2,0 м x 1,5 м). Ширина міжрядь була 15 см, глибина загортання — 5 - 7 см. Інокуляційне навантаження $\sim 1,2 \cdot 10^8$ клітин на насінину. Насіння рослин контрольних варіантів замочували у воді. Відбір експериментального матеріалу проводили тричі впродовж вегетаційного періоду гороху на фазах 4 - 5 листків (14 днів після появи сходів), бутонізації (30 днів після появи сходів) і цвітіння (42 дні після появи сходів).

Пігменти екстрагували з листків рослин гороху 96 % етанолом та спектрофотометрично визначали концентрацію хлорофілу *a*, хлорофілу *b*, каротиноїдів та антоціанів з використанням відповідних коефіцієнтів абсорбції [12, 14]. Концентрацію крохмалю визначали за принципом утворення забарвленого комплексу крохмаль-йод [11], використовуючи для побудови калібрувального графіка водорозчинний картопляний крохмаль. Поглинання комплексу крохмаль-йод визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 600 нм.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми MYNOVA [10], використовуючи критерій Стьюдента. Дані представлені як середнє \pm похибка середнього ($M \pm m$).

Результати та їх обговорення

Для оцінки ефективності бульбочкових бактерій використовують різні показники, серед яких і вміст фотосинтетичних пігментів в листках [1, 5]. Як відомо, симбіотична азотфіксація функціонально пов'язана з фотосинтезом [6, 9]. Це пояснюється тим, що фотосинтез забезпечує бульбочкові бактерії асимілятами та енергетичними ресурсами, а бактерії, в свою чергу, — фотосинтетичний апарат рослини азотними сполуками [5, 9]. Одним із показників, який вчені пропонують використовувати при відборі і селекції ефективних штамів бульбочкових бактерій, є вміст хлорофілу у рослинах [1, 6]. Показано, що за умов інокуляції бактеріями штамів RRL8 та RRL9 концентрація загального хлорофілу (табл. 1) у фазі 4-5 листків була більшою, порівняно з контролем, на 28 % і 18 % відповідно. У фазі бутонізації у рослин, оброблених бактеріями штаму RRL9, значення даного показника були нижчими порівняно з контролем у 1,3 рази. Концентрація загального хлорофілу, при інокуляції бактеріями штамів RRL7, RRL11 і 245а на початкових етапах розвитку рослин, була нижчою і не відрізнялась від контролю у фазах цвітіння і бутонізації. З літератури відомо, що існує позитивний зв'язок між інтенсивністю азотфіксації в бульбочках і вмістом хлорофілу *a* в листках, незалежно від особливостей рослин-господарів і симбіотичних властивостей штамів бульбочкових бактерій [4]. У фазі 4 - 5 листків у рослин, інокульованих бактеріями досліджуваних штамів, концентрація хлорофілу *a* в листках була більшою, порівняно з контролем (табл. 1). Тобто, після обробки бульбочковими бактеріями інтенсивна фіксація азоту може відбуватися вже на ранніх фазах росту гороху. На початкових етапах онтогенезу



у рослин, оброблених бактеріями штамів RRL8 і RRL9, концентрація хлорофілу б була більшою, порівняно з контролем на 32 % та 21 % відповідно, і відбувалось достовірне її зниження протягом розвитку гороху (табл. 1). У рослин, інокульованих бактеріями штамів RRL7, RRL11 і 245а, концентрація даного пігменту у фазі 4 - 5 листків була нижчою відносно контролю, а у фазах бутонізації і цвітіння залишалася незмінною.

Таблиця 1

Концентрація хлорофілів у рослин гороху при обробці насіння бульбочковими бактеріями штамів RRL7, RRL8, RRL9, RRL11, 245а

Table 1

Pea plants Chlorophyll content at seed treatment by nodule bacteria strains RRL7, RRL8, RRL9, RRL11, 245a

Фаза	Варіант	Хлорофіли, мкмоль/ г сирової маси		
		(а+б)	а	б
4-5 листків (14 днів після сходів)	Контроль	2,58 ± 0,11	0,98 ± 0,03	1,60 ± 0,08
	RRL7	1,70 ± 0,085	1,29 ± 0,074	0,41 ± 0,025
	RRL8	3,30 ± 0,154в	1,18 ± 0,081	2,11 ± 0,084в
	RRL9	3,05 ± 0,074в	1,13 ± 0,061а	1,93 ± 0,024в
	RRL11	1,86 ± 0,154	1,41 ± 0,132	0,45 ± 0,025
	245а	1,76 ± 0,085	1,35 ± 0,064	0,42 ± 0,025
бутонізація (30 днів після сходів)	Контроль	2,01 ± 0,11	1,47 ± 0,06	0,54 ± 0,05
	RRL7	1,79 ± 0,17	1,34 ± 0,12	0,45 ± 0,05
	RRL8	1,97 ± 0,21	1,49 ± 0,16	0,48 ± 0,06
	RRL9	1,49 ± 0,153	1,11 ± 0,123	0,38 ± 0,033
	RRL11	1,88 ± 0,13	1,39 ± 0,07	0,49 ± 0,07
	245а	1,71 ± 0,14	1,27 ± 0,12	0,44 ± 0,02
цвітіння (42 дні після сходів)	Контроль	1,94 ± 0,16	1,44 ± 0,12	0,50 ± 0,04
	RRL7	2,13 ± 0,14	1,59 ± 0,11	0,53 ± 0,03
	RRL8	2,05 ± 0,14	1,53 ± 0,11	0,52 ± 0,03
	RRL9	1,59 ± 0,126	1,19 ± 0,096	0,41 ± 0,036
	RRL11	2,20 ± 0,16	1,63 ± 0,12	0,57 ± 0,04
	245а	2,24 ± 0,13	1,68 ± 0,10	0,56 ± 0,03

Примітка: ¹ значення достовірно відмінне від контролю з $P < 0,05$, ² $P < 0,01$, ³ $P < 0,025$, ⁴ $P < 0,005$, ⁵ $P < 0,001$; ^а достовірно відмінне від значень для штаму 245а з $P < 0,025$, ^б $P < 0,005$, ^в $P < 0,001$, $n = 3-6$.

Каротиноїди виконують роль допоміжних пігментів і належать до активних компонентів фотохімічної системи хлоропластів [2, 14]. Вони беруть участь у функціонуванні реакційних центрів і світлозбираючих комплексів фотосистем, ефективно виконують захисні функції: знешкоджують триплетний хлорофіл, синглетний кисень, а також супероксидні радикали [13]. Як видно з таблиці 2, інокуляція місцевими і референтним штамми не впливала на концентрацію каротиноїдів у листках гороху протягом всього періоду онтогенезу рослин гороху.



Виняток становили рослини, оброблені штамом RRL9, де концентрація даного пігменту була нижчою відносно контролю у фазах бутонізації і цвітіння у 1,4 та 1,2 рази відповідно.

Таблиця 2

Концентрація каротиноїдів, антоціанів та крохмалю у рослин гороху при обробці насіння бульбочковими бактеріями штамів RRL7, RRL8, RRL9, RRL11, 245a

Table 2

Pea plant carotenoid, anthocyanins and starch concentration at seed treatment by nodule bacteria strains RRL7, RRL8, RRL9, RRL11, 245a

Фаза	Варіант	Каротиноїди, мкмоль/г сирої маси	Антоціани, мкмоль/г сирої маси	Крохмаль, мг/г сирої маси
4-5 листків (14 днів після сходів)	Контроль	0,59 ± 0,03	0,57 ± 0,04	0,11 ± 0,03
	RRL7	0,58 ± 0,02	0,64 ± 0,016	0,09 ± 0,03
	RRL8	0,56 ± 0,03	0,67 ± 0,021	0,05 ± 0,011
	RRL9	0,60 ± 0,02	0,66 ± 0,021	0,06 ± 0,01
	RRL11	0,64 ± 0,06	0,70 ± 0,032	0,05 ± 0,011
	245a	0,61 ± 0,02	0,68 ± 0,012	0,05 ± 0,011
бутонізація (30 днів після сходів)	Контроль	0,69 ± 0,07	0,57 ± 0,02	0,07 ± 0,01
	RRL7	0,60 ± 0,05	0,59 ± 0,04a	0,08 ± 0,02
	RRL8	0,78 ± 0,13	0,48 ± 0,041	0,05 ± 0,01
	RRL9	0,51 ± 0,051	0,52 ± 0,04	0,08 ± 0,02
	RRL11	0,63 ± 0,04	0,50 ± 0,021	0,13 ± 0,04
	245a	0,56 ± 0,04	0,50 ± 0,022	0,12 ± 0,04
цвітіння (42 дні після сходів)	Контроль	0,61 ± 0,03	0,58 ± 0,04	0,13 ± 0,03
	RRL7	0,62 ± 0,05	0,66 ± 0,07	0,04 ± 0,012
	RRL8	0,61 ± 0,04	0,62 ± 0,03	0,14 ± 0,02a
	RRL9	0,49 ± 0,031 _в	0,48 ± 0,021 _в	0,06 ± 0,012
	RRL11	0,64 ± 0,04	0,62 ± 0,04	0,10 ± 0,02
	245a	0,67 ± 0,04	0,65 ± 0,04	0,08 ± 0,02

Примітка: ¹значення достовірно відмінне від контролю з P<0,05, ²P<0,025; ^а достовірно відмінне від значень для штаму 245a з P<0,05, ^бP<0,01, ^вP<0,005, n=3-6.

Важливу антиоксидантну роль в житті рослин відіграють вакуольні пігменти антоціани. Зростання концентрації антоціанів може бути наслідком дії несприятливих факторів середовища, таких як посуха, ультрафіолетове випромінювання, дія низьких температур, нестача азоту і фосфору, забруднення, а також при інфікуванні бактеріями та грибами [12, 15]. З отриманих результатів видно, що у фазі 4 - 5 листків концентрація антоціанів була більшою, порівняно з контролем, у всіх інокульованих бактеріями рослин (табл. 2). На 30-й день після сходів у рослин гороху, оброблених бактеріями штамів RRL8, RRL11 та 245a, концентрація даних пігментів була нижчою, порівняно з контролем. У фазі цвітіння концентрація антоціанів не відрізнялась від такої в контролі, окрім рослин, інокульованих штамом RRL9, де вона була на 21 % нижчою. Отримані результати узгоджуються з літературними даними, де зазначено зростання концентрації антоціанів при інфікуванні бактеріями та накопичення їх в молодих листках і при старінні рослин [12].



З літератури відомо, що ефективність симбіозу бульбочкових бактерій залежить і від притоку фотоасимілятів у бульбочки на коренях рослин [4]. Продукти фотосинтезу, які утворюються в листках, є основним джерелом енергії для росту бульбочок, дихання бактероїдів і азотфіксації [9]. У фазі 4 - 5 листків (табл. 2) концентрація крохмалю в рослинах *Pisum sativum* L., інокульованих бактеріями штамів RRL8, RRL11 та 245а, була нижчою, порівняно з контролем. Нижчу концентрацію крохмалю в листках інокульованих рослин гороху на початкових етапах росту можна пояснити тим, що в цей період відбувається інтенсивне формування бульбочок, куди і направляється частина ресурсів.

Отримані результати свідчать, що на початкових етапах онтогенезу гороху, рослини, інокульовані бульбочковими бактеріями, мають вищі порівняно з контролем, концентрації хлорофілу *a* та антоціанів, а також відбувається відтік продуктів фотосинтезу в бульбочки. Тобто азотфіксація може відбуватися вже на ранніх фазах росту рослин гороху.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антипчук А. Ф., Краснобрижа О. М., Леонова Н. О., Танцюренко О. В., Путинська Г. О. Особливості формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу за умов забруднення важкими металами // Физиология и биохимия культ. растений. — 2002. — Т.34, № 1. — С. 63 — 69.
2. Ладыгин В. Г. Биосинтез каротиноидов водорослей и его генетический контроль // Успехи соврем. биологии. — 2001. — № 3. — С. 296 — 317.
3. Коць С. Я. Роль біологічного азоту у підвищенні продуктивності сільськогосподарських рослин // Физиология и биохимия культ. растений. — 2001. — Т.33, № 3. — С. 208 — 215.
4. Мандровская Н. М., Охрименко С. М., Киризий Д. А., Старченков Е. П. Влияние инокуляции азотустойчивыми клонами клубеньковых бактерий на интенсивность фотосинтеза и азотфиксации у гороха // Физиология и биохимия культ. растений. — 1995. — 27, № 3. — С. 169 — 173.
5. Охрименко С. М. Вміст пігментів у рослинах гороху при інокуляції клонами бульбочкових бактерій, стійкими до мінерального азоту // Физиология и биохимия культ. растений. — 2001. — 33, № 6. — С. 535 — 538.
6. Патица В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. Біологічний азот. — К.: Світ, 2003. — 424 с.
7. Патыка В. П., Толкачев Н. З., Бутвина О. Ю. Основные направления оптимизации симбиотической азотфиксации в современной земледелии Украины // Физиология и биохимия культ. растений. — 2005. — 37, № 5. — С. 384 — 393.
8. Теннер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. — М.: Агропромиздат, 1987. — 135 с.
9. Тихонович И. А., Прохорова Н. А. *Rhizobiaceae*, молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. — Санкт-Петербург, 2002. — 567 с.
10. Brooks S. P. J. A simple computer program with statistical test for the analysis of enzyme kinetics // BioTechniques. — 1992. — 13. — P. 909 — 911.
11. Chang C. W. Starch and its component ratio in developing cotton leaves // Plant Physiol. — 1979. — 63. — P. 973 — 977.
12. Gitelson A. A., Merzlyak M. N., Chivkunova O. B. Optical properties and non-destructive estimation of anthocyanin content in plant leaves // Photochem. Photobiol. — 2001. — 74, N 1. — P. 38 — 45.
13. Kato M., Ikoma Y., Matsumoto H., Sugiura M. et al. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit // Plant Physiol. — 2004. — 134. — P. 824 — 837.
14. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods Enzymol. — 1987. — 148. — P. 331 — 382.
15. Rossetto M., Vanzani P., Lunelli M. et al. Peroxyl radical trapping activity of anthocyanins and generation of free radical intermediates // Free Radic. Res. — 2007. — 41, № 7. — P. 854 — 859.



УДК 579.64:631.46 + 581.1

У. Я. Стамбульська, В. И. Лушак

Прикарпатский национальный университет
имени В. Стефаныка, ул. Шевченко, 57, Ивано-Франковск, 76025, Украина
тел.: 8 (03422) 714 683; e-mail: lushchak@pu.if.ua

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *RHIZOBIUM* НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ПИГМЕНТОВ И КРАХМАЛА В РАСТЕНИЯХ ГОРОХА

Реферат

Изучено влияние инокуляции клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium* на концентрацию пигментов и крахмала в растениях гороха посевного — *Pisum sativum* L. На начальных этапах онтогенеза гороха концентрация хлорофилла *a* и антоцианов у всех инокулированных бактериями растений была выше по сравнению с контролем. Инокуляция местными штаммами RRL7, RRL8, RRL11 и референтным штаммом *Rhizobium leguminosarum* 245a не влияла на концентрацию каротиноидов в листьях в течение всего периода онтогенеза растений гороха. Концентрация крахмала в фазе 4 - 5 листьев в растениях *Pisum sativum* L., инокулированных бактериями штаммов RRL8, RRL11 та 245a, была ниже, относительно контроля.

К л ю ч е в ы е с л о в а : клубеньковые бактерии, горох посевной, пигменты, крахмал.

УДК 579.64:631.46 + 581.1

U. Ya. Stambulska, V. I. Lushchak

Vassyl Stefanyk Precarpathian National University,
Shevchenko Str., 57, Ivano-Frankivsk 76025, Ukraine
tel.: 8 (03422) 714 683, e-mail: lushchak@pu.if.ua

BACTERIA *RHIZOBIUM* EFFECT ON PIGMENTS AND STARCH CONTENT IN PEA PLANTS

Summary

Influence of inoculation by nodule bacteria *Rhizobium* on the pigments and starch content in pea plants — *Pisum sativum* L. was studied. At the initial stages of the plant ontogenesis, the concentrations of chlorophyll *a* and anthocyanins were higher in all inoculated plants than those in control. The treatment of pea seeds by local wild strains RRL7, RRL8, RRL11 and collection strain *Rhizobium leguminosarum* 245a did not affect the carotenoid concentration in the leaves during the whole ontogenesis period of pea. Starch content in the phase of 4 - 5 the leaves in plants of *Pisum sativum* L. inoculated with the bacteria strains RRL8, RRL11, 245a was lower than in control.

Key words: nodule bacteria, pea, pigments, starch.



Н. Р. Демченко, С. В. Приходько, І. М. Курмакова, О. П. Третяк

Чернігівський державний педагогічний університет імені Т. Г. Шевченка,
вул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернігів, 14013, Україна,
тел.: 8 (0462) 95 69 88, e-mail: demch@micro.net.ua; kurmakova@mail.ru

СУКЦЕСІЯ КОРОЗІЙНОГО МІКРОБНОГО УГРУПОВАННЯ ПРИ ФОРМУВАННІ БІОПЛІВКИ НА СТАЛІЙ ПОВЕРХНІ ЗА ПРИСУТНОСТІ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК

Експериментально доведено, що органічні інгібітори корозії з біоцидною дією впливають на динаміку чисельності бактерій корозійного мікробного угруповання при формуванні біоплівки на поверхні маловуглецевої сталі. Присутність четвертинної солі триазолоазепінію та похідного метилкарбамату значно затримує розвиток сульфатвідновлювальних бактерій у біоплівці, яка формується за умов домінування амоніфікувальних та денітрифікувальних бактерій.

К л ю ч о в і с л о в а: корозійне мікробне угруповання, суцесія, біоплівка, органічні сполуки.

Важливим аспектом у дослідженні мікробної корозії є вивчення формування та функціонування біоплівки, де протікають біоелектрохімічні процеси руйнації металу. Біоплівка як особлива форма організації мікроорганізмів забезпечує фізіологічну та функціональну стабільність корозійного мікробного угруповання та гарантує конкурентне виживання за несприятливих умов [1, 11].

В корозійному мікробному угрупованні при формуванні біоплівки на поверхні металу змінюється якісний та кількісний склад мікроорганізмів, що визначає швидкість мікробної корозії металу [7, 8]. Присутність гетеротрофних бактерій забезпечує формування біоплівки на металевій поверхні за рахунок синтезу екзополімерів, які сприяють стабілізації її структури. Визначено [8], що першими металеву поверхню колонізують амоніфікувальні та денітрифікувальні бактерії, які створюють анаеробні умови для розвитку сульфатвідновлювальних та залізо-відновлювальних бактерій.

Одним із способів інгібування мікробної корозії є введення в агресивне середовище органічних сполук, які одночасно виявляють біоцидну дію щодо корозійно активних мікроорганізмів та гальмують електрохімічну корозію металу [1, 4]. Нами знайдено інгібітори корозії сталі з біоцидними властивостями в ряді четвертинних солей триазолоазепінію [2] та серед хімічних засобів захисту рослин [5, 6, 10]. При цьому суцесія бактерій агресивного мікробного угруповання біоплівки на поверхні сталі вивчена недостатньо.

Метою роботи було дослідити вплив органічних інгібіторів з біоцидною дією на динаміку чисельності бактерій корозійного мікробного угруповання при формуванні біоплівки на поверхні маловуглецевої сталі.



Матеріали і методи. Для проведення досліджень використовували природне корозійно активне мікробне угруповання, яке було виділене нами із феросфери кородуючої поверхні підземного газопроводу методом накопичувальної культури на середовищі Постгейта „В”. Склад мікробного угруповання визначали методом граничних розведень при висіві клітинної суспензії на відповідні рідкі елективні середовища. Сульфатвідновлювальні бактерії (СВБ) виділяли на середовищі Постгейта „В”, залізовідновлювальні бактерії (ЗВБ) — на середовищі Каліненка, денітрифікувальні бактерії (ДНБ) — на середовищі Гільтая, амоніфікувальні бактерії (АМБ) — на м'ясопептонному бульйоні [9]. Асоціантами домінуючих сульфатвідновлювальних бактерій (10^{10} кл/мл) в корозійному мікробному угрупованні є денітрифікувальні (10^6 кл/мл), залізовідновлювальні (10^7 кл/мл) та амоніфікувальні (10^6) бактерії.

Культивування мікробного угруповання проводили за умов періодичного на суміші рідких середовищ Постгейта „В”, Каліненка, Гільтая, м'ясопептонного бульйону в співвідношенні 5:1; 5:1; 5:1 для забезпечення ефективного розвитку бактерій усіх фізіологічних груп за температури 28 ± 2 °С. Подальшу роботу проведено із зазначеним угрупованням. Кількість корозійно активних бактерій у мікробному угрупованні становила:

СВБ — $6 \cdot 10^5$ кл/мл, ЗВБ — $6 \cdot 10^7$ кл/мл, ДНБ та АМБ — $2,5 \cdot 10^8$ кл/мл.

Аналіз сукцесії корозійного мікробного угруповання при формуванні біоплівки без, та за присутності органічних сполук (концентрація 0,1 г/л) на поверхні маловуглецевої сталі вивчали за умов лабораторного експерименту. Досліди проводили в герметичних скляних ємкостях об'ємом 100 мл, які заповнювали зазначеною сумішшю середовищ із внесенням 10 мл суспензії мікробного угруповання (3-х добова культура), в які занурювали підвішені на жилці зразки сталі СтЗпс (площа поверхні 24 см²). Зразки знежирювали ацетоном і активували у розчині 6N H₂SO₄. Повторність дослідів трикратна.

Динаміку розвитку мікробної асоціації досліджували при формуванні біоплівки на поверхні маловуглецевої сталі за присутності інгібіторів мікробної корозії сталі — четвертинної солі триазолоазепінію та похідного метилкарбамату (діюча речовина пестициду бетанал). Облік бактерій на поверхні маловуглецевої сталі проводили на 3, 6, 9, 24, 48, 72, 168, 240 та 336 годину експозиції. Клітини бактерій біоплівки знімали у фіксований об'єм (40 мл) 0,1N фосфатного буфера (рН 7) за допомогою ультразвуку з частотою 25 кГц (30 сек) двічі з інтервалом 60 сек на приладі УЗМ-003/н. Отриманий змив використовували для приготування розведень.

Визначення чисельності бактерій, що адгезувалися за 3 та 6 годин експозиції, проводили методом висіву із розведень на тверді поживні середовища Каліненка, Гільтая та м'ясопептонний агар, анаеробні сульфатвідновлювальні бактерії виявляли глибинним методом Штурм на агаризованому середовищі Постгейта „В” [9]. Кількість колоній бактерій виражали у колонієутворювальних одиницях (КУО). Титр бактерій у біоплівці після 9, 24, 48, 72, 168, 240 та 336 годин експозиції визначали методом граничних десятикратних розведень при висіві суспензії на відповідні рідкі поживні середовища. Чисельність бактерій перераховували на 1 см² поверхні металевого зразка.

Результати та їх обговорення

Після 3 год експозиції у складі біоплівки, що формувалася без та за присутності органічних речовин, виявлені денітрифікувальні, залізовідновлювальні



та амоніфікувальні бактерії. При цьому домінуючими групами бактерій є АМБ та ДНБ, кількість колонієутворювальних одиниць на 1 см^2 відповідно складає $(98,9 \pm 1,6) \cdot 10^3$ та $(77,1 \pm 0,8) \cdot 10^3$ у контролі, $(113,1 \pm 1,3) \cdot 10^3$ та $(103,1 \pm 1,1) \cdot 10^3$ за присутності похідного метилкарбамату $(126,5 \pm 0,6) \cdot 10^3$ та $(113,1 \pm 0,5) \cdot 10^3$ за наявності четвертинної солі. Чисельність ЗВБ у досліджених біоплівках практично однакова та становить $65,4 \cdot 10^3 - 71,7 \cdot 10^3$ КУО/см². Співвідношення чисельності ДНБ: ЗВБ: АМБ складає 1,2:1,0:1,5 у контролі, 1,4:1,0:1,6 в досліді з похідним метилкарбамату та 1,7:1,0:1,9 — з четвертинною сіллю триазолоазепінію. Отже, наявність досліджених інгібіторів стимулює ріст денітрифікувальних та амоніфікувальних бактерій у біоплівці.

При збільшенні часу експозиції до 6 годин у контролі чисельність денітрифікувальних та залізівідновлювальних бактерій збільшується в 1,3 рази, а амоніфікувальних бактерій зменшується в 1,4 рази. У досліді з похідним метилкарбамату чисельність ДНБ збільшується у 1,1 рази, а ЗВБ та АМБ зменшується в 9,7 та 1,2 рази. У досліді з четвертинною сіллю триазолоазепінію чисельність ДНБ не змінюється, а ЗВБ та АМБ зменшується в 4,4 та 2,4 рази. Присутність органічних речовин призводить до зміни у кількісному співвідношенні корозійно активних бактерій у складі агресивного угруповання біоплівки. Пригнічення залізівідновлювальних бактерій компенсується значним розвитком денітрифікувальних та амоніфікувальних бактерій, які здатні трансформувати первинні субстрати, створювати анаеробні умови та забезпечувати низький окисно-відновний потенціал [3].

Динаміка чисельності бактерій корозійного мікробного угруповання у біоплівці на поверхні маловуглецевої сталі при культивуванні від 9 до 336 год наведена на рис. 1 та рис. 2.

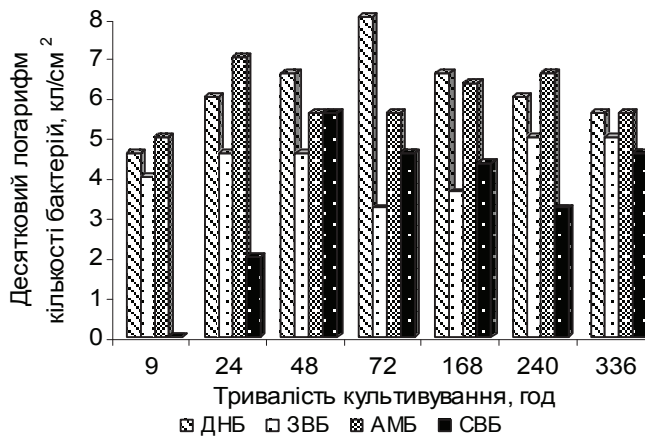


Рис. 1. Динаміка кількості бактерій у біоплівці на поверхні маловуглецевої сталі без органічних сполук

Fig. 1. Bacteria quantity dinamica in the biofilm on the low-carbon steel surface without organic compounds

Після 9 та 24 год експозиції в контролі домінують АМБ, після 48, 72 та 168 год — ДНБ, після 240 год знов АМБ, а після 336 год домінування бактерій певної еколого-трофічної групи не спостерігається (рис. 1). Мінімум чисельності залізівідновлювальних бактерій ($1,7 \cdot 10^3$ кл/см²) зафіксовано після 72 год

культивування. Слід відзначити, що сульфатвідновлювальні бактерії — найбільш агресивні бактерії корозійного мікробного угруповання, виявлені у контролі через 24 год експозиції, що узгоджується з [8]. Отже, в результаті сукцесії утворюється корозійно активне угруповання бактерій, яке є чинником біокорозії сталі.

За присутності похідного метилкарбамату при експозиції 9 та 24 год домінують амоніфікувальні бактерії, при 48, 72 та 168 год — денітрифікувальні бактерії, при 240 год чисельність АМБ та ДНБ зрівнюється, а після 336 год — домінують АМБ. Визначено два мінімуми чисельності залізовідновлювальних бактерій — при 24 та 336 год (рис. 2 а). За присутності четвертинної солі при 9, 72 та 168 год домінують ДНБ, а при 24, 48, 240 та 336 год — АМБ. При цьому мінімальна чисельність залізовідновлювальних бактерій у складі біоплівки спостерігається після 24 та 72 год експозиції (рис. 2 б).

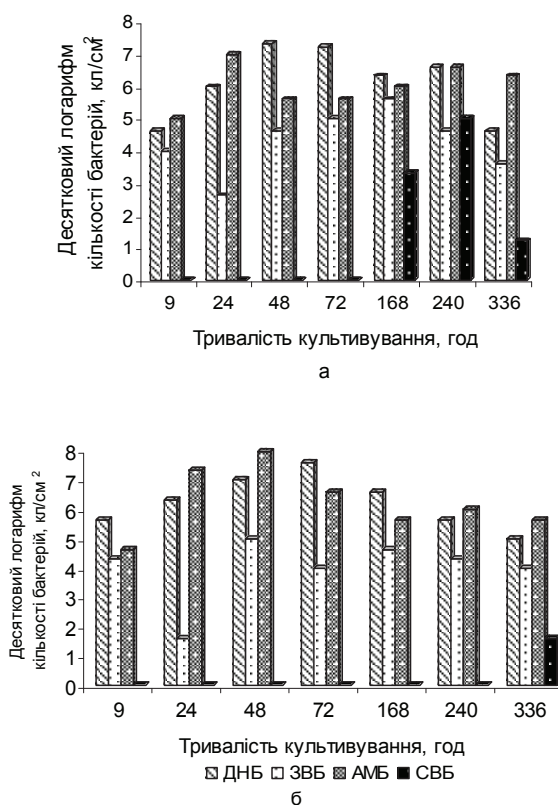


Рис. 2. Динаміка кількості бактерій у біоплівці на поверхні маловуглецевої сталі за присутності органічних сполук: а — похідне метилкарбамату, б — четвертинна сіль триазолоазепінію

Fig. 2. Bacteria quantity dinamica in the biofilm on the low-carbon steel surface in the presence of organic compounds: a — derivative methhylcarbamate; b — quaternary salt of triazoloazepinium

У біоплівці, сформованій за присутності похідного метилкарбамату, сульфатвідновлювальні бактерії виявляються через 168 год (рис. 2 а), а за присутності четвертинної солі триазолоазепінію — лише через 336 год експозиції (рис. 2 б). Це може бути пояснено біоцидною дією похідного метилкарбамату та



четвертинної солі триазолоазепінію, що показано нами раніше [2, 6]. При цьому четвертинна сіль має більшу біоцидну дію, що узгоджується з часом початку розвитку СВБ.

За присутності органічних сполук біоплівка формується на поверхні маловуглецевої сталі без участі сульфатвідновлювальних бактерій, що певним чином пояснює інгібувальну дію речовин за умов мікробної корозії: захисний ефект для четвертинної солі триазолоазепінію становить 74,0 %, для похідного метилкарбамату – 71,8 %.

Отже, під час руйнування металу залежно від складу агресивного середовища корозійне мікробне угруповання проходить сукцесійний цикл домінуючих груп бактерій. На кожному етапі сукцесії домінують ті групи бактерій, які найбільшою мірою адаптувалися як до умов існування, так і до трансформації наявного джерела живлення. Домінування бактерій певної фізіологічної групи у мікробному угрупованні створює оптимальні умови для розвитку наступної. Це сприяє взаємовигідному функціонуванню корозійно небезпечних бактерій у мікробній сукупності. Експериментально доведено, що четвертинна сіль триазолоазепінію та похідне метилкарбамату з біоцидною дією щодо СВБ впливають на динаміку чисельності бактерій корозійного мікробного угруповання при формуванні біоплівки на поверхні маловуглецевої сталі. Присутність органічних речовин значно затримує розвиток сульфатвідновлювальних бактерій у біоплівці, яка формується за умов домінування амоніфікувальних і денітрифікувальних бактерій та забезпечує захист сталі від мікробної корозії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андреев К.І., Козлова І. П., Коптева Ж. П., Піляшенко-Новохатний А.І., Заніна В. В., Пуриш Л. М. Мікробна корозія підземних споруд. – Київ: Наук. думка, 2005. – 259 с.
2. Демченко Н. Р., Курмакова І. М., Третяк О. П. Біоцидна дія четвертинних триазолоазепінієвих солей на корозійно небезпечні мікробні угруповання // Науковий вісник Ужгородського університету. – Серія Біологія. – Вип. 20, 2007. – С. 18-21.
3. Заварзин Г. А., Колотилова Н. Н. Введение в природоведческую микробиологию. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 2001. – 255 с.
4. *Защита от коррозии, старения и биоповреждений машин, оборудования и сооружений.* Справочник в 2 т. / Под ред А. А. Герасименко. – М.: Машиностроение, 1987. – Т. 2. – 784 с.
5. Курмакова И. Н., Третяк А. П., Лохова В. И., Смыкун Н. В. Пестициды как ингибиторы биокоррозии // Экотехнологии и ресурсосбережение. – 2000. – № 2. – С. 14-17.
6. Курмакова І., Приходько С., Демченко Н., Третяк О. Пестициди як антропогенний фактор біопшкодження сталі у ґрунті // Фізико-хімічна механіка матеріалів. – 2008. – Спец. вип. № 7. – С. 634-638.
7. Протасова М. О., Лазарев В. Г., Козлова І. П. Дослідження структури біоплівок, сформованих бактеріями циклу сірки на металевих матрицях // Мікробіол. журн. – 2006. – Т. 68, № 5. – С. 80-86.
8. Пуриш Л. М., Асауленко Л. Г. Динаміка сукцесійних змін у сульфідогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі // Мікробіол. журн. – 2007. – Т. 69, № 6. – С. 19-25.
9. Романенко В. И., Кузнецов С. И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. – Ленинград: Наука, 1974. – 196 с.
10. Смыкун Н. В., Третяк А. П., Курмакова И. Н. Анतिकоррозионное действие некоторых пестицидов в условиях почвенной коррозии // Мікробіол. журн. – 2001. – Т. 63, № 4. – С. 85-90.
11. Lewandowski Z. Structure and function of bacterial biofilms // Biofilms: recent advances in their study and control / Ed. by L. V. Evans. – Haywood: Haywood Acad. publ., 2000. – P. 2-17.



Н. Р. Демченко, С. В. Приходько, І. Н. Курмакова, А. П. Третяк

Черниговский государственный педагогический университет
имени Т. Г. Шевченко

ул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернигов, 14013, Украина,
тел.: 8 (0462) 95 69 88, e-mail: demch@micro.net.ua; kurmakova@mail.ru

СУКЦЕССИЯ КОРРОЗИОННОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ БИОПЛЕНКИ НА СТАЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ В ПРИСУТСТВИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Реферат

Показана сукцессия коррозионного микробного сообщества биопленки при разрушении стали. Экспериментально установлено, что органические вещества с биоцидным действием по отношению к сульфатвосстанавливающим бактериям влияют на динамику численности микроорганизмов коррозионного микробного сообщества при формировании биопленки на поверхности малоуглеродистой стали. Присутствие четвертичной соли триазолоазепиния и производного метилкарбамата значительно задерживает развитие сульфатвосстанавливающих бактерий в биопленке, которая формируется при доминировании аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий, и обеспечивает защиту стали от микробной коррозии.

К л ю ч е в ы е с л о в а: коррозионное микробное сообщество, сукцессия, биопленка, органические соединения.

N. R. Demchenko, S. V. Prichodko, I. N. Kurmakova, A. P. Tretyak

Chernihiv Shevchenko State Pedagogical University
Getman Polubotok Str., 53, Chernihiv, 14013, Ukraine

SUCCESSION OF CORROSION MICROBIAL ASSOCIATION AT BIOFILM FORMING ON THE STEEL SURFACE IN THE PRESENCE OF ORGANIC COMPOUNDS

Summary

The succession of corrosive microbial association of biofilm at steel destruction is shown. It is experimentally determined that organic compounds with biocide action influence on the dynamics of bacteria quantity corrosive microbial association at forming of biofilm on the low-carbon steel surface. The presence of quaternary salt of triazoloazepinium and derivative methylcarbamate considerably detains the development of sulphate-restored bacteria in biofilm, formed under condition of dominance of ammonifying and denitrifying bacteria and provides protection of steel from microbial corrosion.

К e y w o r d s: corrosion microbial association, successions, biofilm, organic compounds.



12-Й МІЖНАРОДНИЙ ДРІЖДЖОВИЙ КОНГРЕС
Київ, 11-15 серпня 2008

12TH INTERNATIONAL CONGRESS ON YEASTS
Kyiv, 11-15 August 2008

В Україні дослідження, присвячені вивченню дріжджів, стрімко розширилися та отримали багато нових напрямків. Вони, перш за все, включають молекулярно-генетичні аспекти та багато інших напрямів метаболічної інженерії. Традиційно розвивається вивчення систематики, фізіології, біохімії та екології дріжджів.

Здобутки українських вчених дали можливість організувати 12-й Міжнародний дріжджовий конгрес (12th International Congress on Yeasts “Yeasts For Human Progress”, Kyiv, 11-15 August 2008). Конгрес проходив 11-15 серпня 2008 р. у Києві на базі Національного авіаційного Університету. Організаторами конференції були Національна академія наук України, Українське товариство клітинної біології, Інститут клітинної біології НАН України (ІКБ НАН України), Міжнародна дріжджова комісія, Інститут мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, Національний авіаційний університет України, університет Жешува (Польща).

Значну роботу по підготовці та проведенню Міжнародного дріжджового Конгресу провели секретаріат і організаційний комітет, який очолив директор Інституту клітинної біології НАН України, чл.-кор. НАН України А. А. Сибірний.

На Конгресі представили свої роботи понад 350 фахівців з 39 країн світу. Учасників конференції привітали чл.-кор. НАН України А. А. Сибірний (голова організаційного комітету конгресу, директор ІКБ НАН України), академік НАН України М. Г. Луцький (перший проректор Національного авіаційного університету), академік НАН України С. Комісаренко (академік-секретар Відділення молекулярної біології, біохімії, експериментальної і клінічної фізіології НАН України).

Роботу Конгресу доповіддю “Протеолітична система убіквітину: від основних механізмів через людські хвороби до мішеней ліків” розпочав Нобелівський лауреат 2004 року з хімії Аарон ЧічанOVER (Ізраїль).

На Конгресі були заслухані 11 пленарних лекцій: А. ЧічанOVER (Ізраїль), Дж. Атчінсон (США), М. Болотін-Фукухара (Франція), Дж. Крегг (США), Т. Джефріс (США), А. Хайнебуш (США), В. Лонго (США), Й. Осумі (Японія), К. Струл (США), С. Субрамані (США), Дж. Тевелейн (Бельгія). Крім того, 121 наукова лекція, короткі наукові виступи та 200 презентацій постерів були заслухані на 21 паралельних секціях: молекулярна систематика дріжджів, екологія дріжджів, харчові та пивні дріжджі, важливі дріжджі для медицини, новітні інструменти дріжджових дослі-

джені, системна біологія, геноміка і протеоміка, транскрипційна та трансляційна регуляція, клітинний цикл, сприйняття та передача сигналів, структура мембран та їх функції, рух і секреція, відповідь на стрес, органели та автофагія, дріжджі, як модель для захворювань людини та тестування ліків, продукція гетерологічних білків, метаболічна інженерія, дріжджі для виробництва паливного етанолу та інших біопалив, біохімічна інженерія, біохімія та фізіологія дріжджів.

Основними питаннями, що розглядались протягом всієї роботи Конгресу, були рекласифікація аскоміцетних та базидіоміцетних дріжджів, дослідження філогенетичних зв'язків і генетичного різноманіття (К. Куртцман, США; М. Сузукі, Японія та інш.), деякі аспекти транскрипційної та трансляційної регуляції (З. Ліу, США, М. Іванов, Росія; Н. Петрик, Україна та інш.).

Значна увага приділялась обговоренню питань, пов'язаних з особливостями продукування гетерологічних білків (Д. Маттановіч, Австрія; Х. Ц. Роса, Бразилія; Л. Сарайва, Португалія; О. Іванова, Україна та інш.).

Традиційним у роботі Конгресу був напрямок, присвячений дослідженням, які проводяться з харчовими, пивними та винними дріжджами. Особлива увага вчених приділялась використанню стартерних культур дріжджів у виноробстві (П. Романо, Італія); біорізноманіттю та функціональним особливостям дріжджів, що культивуються у промислових ферментерах (П. Распор, Словенія); особливостям життєвого циклу дріжджів (Г. Фліт, Австралія), дослідженню природи синтезу 2-фенілетанолу та етанолу дріжджами (О. Мамеева, Україна); промислового застосуванню дріжджів, здатних ферментувати кавові боби (Г. Фліт, Австралія); питанням еволюції диких та музейних штамів сахароміцетів (Г. Наумов, Росія); фізіологічній та генетичній характеристиці штамів дріжджів з вина та пива (Т. Бабіч, Україна); вивченню молекулярних характеристик штамів сахароміцетів (Х.-М. Даніель, Бельгія).

При роботі секції стресових відповідей дріжджів розглядалась важлива роль метаболізму глутатіону у стійкості до окислювального стресу у дріжджів та у відповідь до факторів оточуючого середовища, модифікація окислювального стресу антиоксидантами (Г. Бартош, Польща; Ю. Борецький, Україна), та багато інших питань.

Конгрес відзначив перспективність такого напряму роботи, як метаболічна інженерія. Наукові лекції були присвячені питанням генетичного контролю синтезу рибофлавіну та метаболічній інженерії флавіногенних дріжджів для конструювання ефективних надпродуцентів флавінів (А. Сибірний, Україна), метаболічній інженерії сахароміцетів для більш ефективної ферментації пентоз, продукування молочної кислоти. Також були проаналізовані окислювальні шляхи катаболізму вуглеводів (А. ван Маріс, Нідерланди; Т. Оніші, Японія; П. Ричард, Фінляндія; С. Парижак, Ю. Ребець, В. Яцишин, Україна та інш.).

Були розглянуті питання екології дріжджів (Дж. Шнурер, Швеція; М. Сіпіцький, Угорщина та інш.). У багатьох повідомленнях були проаналізовані особливості синтезу біоетанолу, софороліпідів, ресвератролу, аскорбінової кислоти, а також питання застосування біосенсорів на основі дріжджів для аналізу речовин. (С. Дзядевич, Україна; К. Дмитрук, Україна; М. Голдфілд, США; Г. Гайда, Україна).

На сьогодні найактуальнішими є питання зі застосування біомаси дріжджів для виробництва паливного етанолу та інших біопалив, і пов'язані з ними питання біохімічної інженерії, а також безпосередньо біохімії та фізіології дріжджів (А. Ра-



попорт, Латвія; М. Гончар, Україна; Ж. Ческот, Франція; В. Борецький, Україна; Ю. Піняха, Україна).

У дослідженнях все частіше застосовуються методи молекулярної мікробіології та генетики (секція “Новітні інструменти досліджень дріжджів”).

Успішно продовжується вивчення структури і функцій мембран, органел, клітинного циклу дріжджів, розробляються моделі дослідження людських хвороб на основі клітини дріжджів (О. Смуток, Україна; І. Гапала, Словачія; Ю. Стольц, Німеччина; Б. Дьюон, Франція; Ю. Піскур, Швеція та інш.).

Підбиваючи підсумки роботи Міжнародного дріжджового конгресу, слід відзначити високий рівень досліджень всіх можливих теоретичних та практичних аспектів застосування клітин дріжджів, що проводяться у всьому світі та в Україні.

О. МАМЕЄВА



АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У 2007–2008 РОКАХ У ЖУРНАЛІ “МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ”

<i>Айзенберг В.Л.</i> див. <i>Жданова Н.М.</i>	2008	3	58
<i>Артишкова Л.В.</i> див. <i>Жданова Н.М.</i>	2008	3	58
<i>Барбуташвілі Т.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	1	23
<i>Бойко Н.В.</i> див. <i>Лукачинець Л.Ю.</i>	2008	3	75
<i>Болога О.А.</i> див. <i>Десятник А.А.</i>	2007	1	46
<i>Борзова Н.В.</i> див. <i>Варбанець Л.Д.</i>	2008	3	8
<i>Броварська О.С.</i> див. <i>Рзаєва О.М.</i>	2008	2	20
<i>Brovarska O.S.</i> див. <i>Didenko L.F.</i>	2008	1	18
<i>Бурець Е.Д.</i> див. <i>Коев Г.В.</i>	2008	2	76
<i>Бурлака Т.В.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	1	93
<i>Бурцева С.А., Сырбу Т. Ф., Сланина В.А., Толочкина С.А., Кодряну С.Н.</i> Антагонистические свойства новых штаммов микроорганизмов, выделенных из почв Молдовы.....	2007	1	40
<i>Бурцева С.А.</i> див. <i>Коев Г.В.</i>	2008	2	76
<i>Бухтіяров А.Є.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	2	64
<i>Буценко Л.Н.</i> див. <i>Клочко В.В.</i>	2008	1	44
<i>Варбанець Л.Д.</i> див. <i>Рзаєва О.М.</i>	2008	2	20
<i>Варбанець Л.Д., Борзова Н.В.</i> Ксиланази мікроорганізмів	2008	3	8
<i>Varbanets L.D.</i> див. <i>Didenko L.F.</i>	2008	1	18
<i>Василевська А.І.</i> див. <i>Жданова Н.М.</i>	2008	3	58
<i>Венгер А.М.</i> див. <i>Ліманська Н.В.</i>	2008	3	64
<i>Вінніков А.І.</i> див. <i>Воронкова О.С.</i>	2008	2	70
<i>Водзінська Н.С., Зінченко О.Ю., Філіпова Т.О., Галкін Б. М., Водзінський С.В., Ішков Ю.В.</i> Чутливість <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> FA2 до дії синтетичних порфіринів	2008	2	55
<i>Водзінська Н.С., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Ішков Ю.В., Кириченко Г.М.</i> Інактивація стафілококового бактеріофага в присутності синтетичних порфіринів.....	2008	3	82
<i>Водзінський С.В.</i> див. <i>Водзінська Н.С.</i>	2008	2	55
<i>Волкова І.В.</i> див. <i>Гончар Ю.А.</i>	2007	1	27
<i>Воронкова О.С., Полішко Т.М., Сірокваша О.А., Вінніков А.І.</i> Деякі показники імунітету білих лабораторних мишей в нормі та при різних патологічних станах	2008	2	70
<i>Вострова Л.М.</i> див. <i>Малярчик І.О.</i>	2008	3	40
<i>Галкін М.Б., Жиліна З.І., Ішков Ю.В., Петрова М.О., Іваниця В.О.</i> Вплив комплексу мезо-тетра (4- <i>N</i> -метил-піридил) порфірину з вісмутом на ріст та формування біоплівки <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	2008	1	86
<i>Галкін Б.М.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	1	23
<i>Галкін Б.М.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	2	31
<i>Галкін Б.М.</i> див. <i>Водзінська Н.С.</i>	2008	2	55
<i>Галкін Б.М.</i> див. <i>Водзінська Н.С.</i>	2008	3	82



Галкін Б.М. див. <i>Малярчик І.О.</i>	2008	3	40
Галушка А.А., <i>Перетятко Т.Б., Гудзь С.П.</i> Вплив сірководню на <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2008	3	49
Гвоздяк П.І. див. <i>Кузьмінський Є.В.</i>	2008	3	21
Гнатуш С.О. див. <i>Горішний М.Б.</i>	2008	1	50
Голуб Н.Б. див. <i>Кузьмінський Є.В.</i>	2008	3	21
Гончар Ю.А., <i>Надкерничная Е.В., Волкова И.В.</i> Формирование искусственного симбиоза азоспирилл с растениями шелковицы ..	2007	1	27
Горішний М.Б., <i>Гудзь С.П., Гнатуш С.О.</i> Ріст <i>Chlorobium</i> <i>limicola</i> YA-2002 за різних умов культивування	2008	1	50
Горшкова О.Г. див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	2	31
Гренадьорова М.В. див. <i>Малярчик І.О.</i>	2008	3	40
Гудзенко Т.В. див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	2	31
Гудзенко Т.В. див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	1	23
Гудзенко Т.В. див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	1	93
Гудзь С.П. див. <i>Горішний М.Б.</i>	2008	1	50
Гудзь С.П. див. <i>Павлова Ю.О.</i>	2008	1	79
Гудзь С.П. див. <i>Галушка А.А.</i>	2008	3	49
Демченко Н.Р., <i>Приходько С.В., Курмакова І.М., Третяк О.П.</i> Сукцесія корозійного мікробного угруповання при форму- ванні біоплівки на сталевій поверхні за присутності органічних сполук	2008	3	95
Десятник А. А., <i>Тюрина Ж.П., Лаблюк С.В., Болога О.А.,</i> <i>Лазареску А.Г.</i> Особенности биосинтеза липаз штаммом <i>Aspergillus niger</i> CNMN FD 01L на средах оптимального состава	2007	1	46
Десятник А.А. див. <i>Стратан М.В.</i>	2007	1	60
<i>Didenko L.F., Varbanets L.D., Sabirova T.Yu., Serdenko O.V.,</i> <i>Brovarska O.S., Spivak N.Ya.</i> Monosaccharide composition of rhabdoviruses infecting animals and plants	2008	1	18
Драгалін І.П. див. <i>Чинчлей А.Г.</i>	2007	1	34
Драгоева Е.Г. див. <i>Каракис С.Г.</i>	2008	1	58
Жданова Н.М., <i>Олішевська С.В., Василевська А.І., Айзенберг В.Л.,</i> <i>Купченко І.М., Артишкова Л.В., Наконечна Л.Т., Капічон Г.П.</i> Скринінг штамів мікроміцетів, що здатні рости та руйнувати целюлозовмісний субстрат	2008	3	58
Жиліна З.І. див. <i>Галкін М.Б.</i>	2008	1	86
<i>Жуковская Л.А., Михайлова Р.В., Семашко Т.В., Лобанок А.Г.,</i> <i>Ярмолинский Д.Г., Картель Н.А.</i> Клонирование гена глюкозооксидазы в <i>Penicillium adametzii</i> ЛФ F-2044.1.....	2008	3	31
Зайцев Ю.П. Сообщество микроорганизмов поровых вод песчаных пляжей Черного моря. Факты и гипотезы	2008	2	8
Захарова О.О., <i>Кожухова Н.Е., Сиволап Ю.М.</i> ПЛР-аналіз мінливості геному та розробка технології ідентифікації грибів роду <i>FUSARIUM</i>	2008	2	48
Зінченко О.Ю. див. <i>Водзінська Н.С.</i>	2008	2	55

<i>Іваниця В.О.</i> II літня школа “Молекулярна мікробіологія і біотехнологія”. Одеса, 14-26 травня 2007 р.	2007	1	93
<i>Іваниця В.О., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Гудзенко Т.В., Русакова М.Ю., Степанова Т.Ю., Іваниця Т.В., Чанишвілі Н., Барбуташвілі Т.</i> Вплив препарату бактеріофага <i>Clostridium perfringens</i> на функціональний стан макрофагів	2008	1	23
<i>Іваниця В.О., Бурлака Т.В., Юргелайтіс Н.Г., Гудзенко Т.В., Кожанова Г.А., Котлярова Л.Б.</i> Пам’яті професора В.П. Тульчинської	2008	1	93
<i>Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Іваниця Т.В., Горшкова О.Г., Чанишвілі Н.</i> Оцінка цитотоксичних властивостей бактеріофага <i>Clostridium perfringens</i> <i>in vitro</i> на моделі перещеплюваної культури клітин людини Нер-2	2008	2	31
<i>Іваниця В.О., Бухтіяров А.Є.</i> Стійкість бактеріопланктону Одеського прибережжя до свинцю, кадмію та ртуті	2008	2	64
<i>Іваниця В.О.</i> див. <i>Галкін М.Б.</i>	2008	1	86
<i>Іваниця В.О.</i> див. <i>Ліманська Н.В.</i>	2008	3	64
<i>Ivanutsya V.O.</i> див. <i>Rakhitova O.L.</i>	2008	1	18
<i>Іваниця Т.В.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	1	23
<i>Іваниця Т.В.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	2	31
<i>Іваниця Т.В.</i> Міжнародна наукова конференція “Фагова біологія, екологія та терапія”	2008	2	114
<i>Ішков Ю.В.</i> див. <i>Галкін М.Б.</i>	2008	1	86
<i>Ішков Ю.В.</i> див. <i>Водзінська Н.С.</i>	2008	2	55
<i>Ішков Ю.В.</i> див. <i>Водзінська Н.С.</i>	2008	3	82
<i>Капічон Г.П.</i> див. <i>Жданова Н.М.</i>	2008	3	58
<i>Капрельянци Л.В.</i> Словник як навчальний посібник	2007	1	96
<i>Каракис С.Г., Карпов Л.М., Драгоєва Е.Г., Лавренюк Т.И., Сагаріц В.А., Марченко В.С.</i> Биохимический состав биомассы штаммов <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	2008	1	58
<i>Карпов Л.М.</i> див. <i>Каракис С.Г.</i>	2008	1	58
<i>Картель Н.А.</i> див. <i>Жуковская Л.А.</i>	2008	3	31
<i>Киприанова Е.А.</i> див. <i>Клочко В.В.</i>	2008	1	44
<i>Кириченко Г.М.</i> див. <i>Водзінська Н.С.</i>	2008	3	82
<i>Клочко В.В., Остапчук А.Н., Буценко Л.Н., Онищенко О.М., Киприанова Е.А.</i> Жирнокислотный состав бактерий рода <i>Psychrobacter</i> , выделенных из воды Черного моря	2008	1	44
<i>Коваленко Н.К.</i> див. <i>Полтавська О.А.</i>	2008	1	8
<i>Ковтун О.А.</i> Новые таксоны диатомовых водорослей бентоса Тилигульского лимана (Северо-западное Причерноморье) ...	2008	1	36
<i>Кодряну С.Н.</i> див. <i>Бурцева С.А.</i>	2007	1	40
<i>Кожанова Г.А.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	1	93
<i>Кожухова Н.Е.</i> див. <i>Захарова О.О.</i>	2008	2	48
<i>Коев Г.В., Бурец Е.Д., Швец С.В., Бурцева С.А.</i> Применение местных штаммов молочнокислых бактерий в производстве сыра с использованием соевого белка	2008	2	76
<i>Копылов Е.П.</i> Селекция эффективных штаммов diaзотрофов для инокуляции яровой пшеницы	2007	1	67



<i>Котлярова Л.Б.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	1	93
<i>Кузнєцов В.О., Кузнєцова Н.В.</i> Життя та науково-педагогічна діяльність академіка Д.К. Заболотного в Одесі (28.12.1866 – 15.12.1929)	2007	1	82
<i>Кузнєцов В.О.</i> Життя та науково-педагогічна діяльність члена-кореспондента АН УРСР Л. Й. Рубенчика (03.04.1896 – 14.12.1988)	2008	2	94
<i>Кузнєцова Н.В.</i> див. <i>Кузнєцов В.О.</i>	2007	1	82
<i>Кузьмінський Є.В., Гвоздяк П.І., Голуб Н.Б.</i> Біопаливні елементи – проблеми і перспективи розвитку І. Ферментні паливні елементи. 2008	2008	3	21
<i>Курмакова І.М.</i> див. <i>Демченко Н.Р.</i>	2008	3	95
<i>Курченко І.М.</i> див. <i>Жданова Н.М.</i>	2008	3	58
<i>Лаблюк С.В.</i> див. <i>Десятник А.А.</i>	2007	1	46
<i>Лавренюк Т.И.</i> див. <i>Каракис С.Г.</i>	2008	1	58
<i>Лазареску А.Г.</i> див. <i>Десятник А.А.</i>	2007	1	46
<i>Лещук Т.Й.</i> Рецензія на навчальний посібник В.О. Іваниці, В.С. Підгорського, Н.Г. Юргелайтіс, Т.В. Бурлаки, Б.П. Мацелюха, І.Г. Скрипаля “Словник термінів у мікробіології”	2008	1	100
<i>Ліманська Н.В.</i> III літня школа з молекулярної мікробіології і біотехнології. Одеса, 12-30 травня 2008 р.	2008	2	111
<i>Ліманська Н.В., Венгер А.М., Шуай Є., Іваниця В.О.</i> Вивчення адгезивних властивостей штамів збудників бактеріального раку винограду	2008	3	64
<i>Лобанок А.Г.</i> див. <i>Жуковская Л.А.</i>	2008	3	31
<i>Лукачинець Л.Ю., Чундак С.Ю., Бойко Н.В.</i> Антибактеріальна активність комплексних сполук нітрату кадмію (II) з 3-, 4-нітробензгідразидами	2008	3	75
<i>Луцак В.І.</i> див. <i>Стамбульська У.Я.</i>	2008	3	89
<i>McEldowney S.</i> див. <i>Rakhitova O.L.</i>	2008	1	18
<i>Малашенко Ю.Р.</i> див. <i>Рокитко П.В.</i>	2007	1	10
<i>Малярчик І.О., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Вострова Л.М., Гренадьорова М.В.</i> Антимікробні властивості N-бензотіазол-2-їл-бензенсульфонаміду і його аналогів з нуклеофільними замісниками	2008	3	40
<i>Мамеева О.Г.</i> Мікробіологія і біотехнологія. 12-й міжнародний дріжджовий конгрес. Київ, 11-15 серпня 2008 р.	2008	3	101
<i>Мамеева О.Г., Нагорная С.С., Остапчук А.М., Подгорский В.С.</i> Внуклеточные полисахариды дрожжей <i>Cryptococcus albidus</i> (Saito) Skinner.....	2008	1	29
<i>Мамеева О.Г., Підгорський В.С.</i> Оптимізація біосорбції іонів Сг (VI) дріжджами <i>S. cerevisiae</i> УКМ У-1968 методами статистичного аналізу	2008	2	37
<i>Марченко В.С.</i> див. <i>Каракис С.Г.</i>	2008	1	58
<i>Михайлова Р.В.</i> див. <i>Жуковская Л.А.</i>	2008	3	31
<i>Нагорная С.С.</i> див. <i>Мамеева О.Г.</i>	2008	1	29
<i>Надкерничная Е.В.</i> див. <i>Гончар Ю.А.</i>	2007	1	27
<i>Наконечна Л.Т.</i> див. <i>Жданова Н.М.</i>	2008	3	95

Олішевська С.В. див. Жданова Н.М.	2008	3	58
Онищенко О.М. див. Клочко В.В.	2008	1	44
Осійчук О.В. див. Романовська І.І.	2008	1	72
Остапчук А.М. див. Мамеева О.Г.	2008	1	29
Остапчук А.Н. див. Клочко В.В.	2008	1	44
Павлова Ю.О., Гудзь С.П. Використання гідроген сульфїду та нагромадження елементної сірки в клітинах <i>THIOCYSTIS SP YA 2006</i>	2008	1	79
Петрова М.О. див. Галкін М.Б.	2008	1	86
Перетятко Т.Б. див. Галушка А.А.	2008	3	49
Підгорський В.С. див. Мамєєва О.Г.	2008	2	37
Подгорский В.С. див. Мамеева О.Г.	2008	1	29
Позур В.В., Сківка Л.М., Потебня Г.П. Реакція лімфоїдних органів мишей на пептидоглікан <i>Staphylococcus aureus</i> Wood 46 в нормі і при пухлинному рості	2008	3	69
Полішко Т.М. див. Воронкова О.С.	2008	2	70
Полтавська О.А., Коваленко Н.К. Біфідобактерії і їх біологічні властивості	2008	1	8
Потебня Г.П. див. Позур В.В.	2008	3	69
Приходько С.В. див. Демченко Н.Р.	2008	3	95
Растимешина И.О. див. Чинчлей А.Г.	2007	1	34
Rakhitova O.L., Ivanytsya V.O., McEldowney S. Permanent Attachment of <i>Mucosoccus xanthus</i>	2007	1	18
Рзаєва О.М., Варбанець Л.Д., Броварська О.С. Деякі власти- вості α -L-рамнозидаз <i>Penicillium commune</i> 266	2008	2	20
Рокитко П.В., Романовська В.О., Малащенко Ю.Р. Синтаболізм неростових субстратів метанотрофними бактеріями	2007	1	10
Романовська В.О. див. Рокитко П.В.	2007	1	10
Романовська І.І., Осійчук О.В., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В. Ферментативні методи елімінації фенольних полютантів	2008	1	72
Русакова М.Ю. див. Іваниця В.О.	2008	1	23
Sabirova T.Yu. див. Didenko L.F.	2008	1	18
Сагаріц В.А. див. Каракис С.Г.	2008	1	58
Saripova L.I. Xylose isomerase synthesis in actinobacteria <i>Arthrobacter ureafaciens</i> ВІМ В-6	2008	1	64
Севастьянов О.В. див. Романовська І.І.	2008	1	72
Семашко Т.В. див. Жуковская Л.А.	2008	3	31
Serdenko O.V. див. Didenko L.F.	2008	1	18
Сірокваша О.А. див. Воронкова О.С.	2008	2	70
Сиволап Ю.М. див. Захарова О.О.	2008	2	48
Сківка Л.М. див. Позур В.В.	2008	3	69
Скрипаль І. Г. Мрія Д.К. Заболотного, що здійснилася	2008	2	83
Сланина В.А. див. Бурцева С.А.	2007	1	40
Соловійова І.Л. див. Ямборко Г.В.	2007	1	53
Spivak N.Ya. див. Didenko L.F.	2008	1	18



<i>Стамбульська У.Я., Луцзяк В.І.</i> Вплив бактерій роду <i>Rhizobium</i> на концентрацію пігментів і крохмалю у рослин гороху	2008	3	89
<i>Степанова Т.Ю.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	1	23
<i>Стратан М.В., Десятник А.А.</i> Влияние посевного материала на амилитическую активность штамма <i>Aspergillus niger 33-19</i> CNMN FD-02 A	2007	1	60
<i>Сырбу Т.Ф.</i> див. <i>Бурцева С.А.</i>	2007	1	40
<i>Толочкина С.А.</i> див. <i>Бурцева С.А.</i>	2007	1	40
<i>Толочкина С.А.</i> див. <i>Чинчлей А.Г.</i>	2007	1	34
<i>Третьяк О.П.</i> див. <i>Демченко Н.Р.</i>	2008	3	95
<i>Тюрина Ж.П.</i> див. <i>Десятник А.А.</i>	2007	1	46
<i>Філіпова Т.О.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	2	31
<i>Філіпова Т.О.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	1	23
<i>Філіпова Т.О.</i> див. <i>Водзінська Н.С.</i>	2008	2	55
<i>Філіпова Т.О.</i> див. <i>Водзінська Н.С.</i>	2008	3	82
<i>Філіпова Т.О.</i> див. <i>Малярчик І.О.</i>	2008	3	40
<i>Чабанюк Я.В.</i> див. <i>Чайковська В.В.</i>	2007	1	75
<i>Чайковська В.В., Чабанюк Я.В., Шерстобоева О.В.</i> Поліфункціональний мікробний комплекс для інтегрованих систем землеробства	2007	1	75
<i>Чанішвілі Н.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	1	23
<i>Чанішвілі Н.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	2	31
<i>Чинчлей А.Г., Толочкина С.А., Растимешина И.О., Драгалін И.П.</i> Новые продукты микробной трансформации склареола: получение, свойства, оценка	2007	1	34
<i>Чундак С.Ю.</i> див. <i>Лукачинець Л.Ю.</i>	2008	3	75
<i>Швец С.В.</i> див. <i>Ков Г.В.</i>	2008	2	76
<i>Шерстобоева О.В.</i> див. <i>Чайковська В.В.</i>	2007	1	75
<i>Шестеренко Ю.А.</i> див. <i>Романовська І.І.</i>	2008	1	72
<i>Шуай Є.</i> див. <i>Ліманська Н.В.</i>	2008	3	64
<i>Юргелайтіс Н.Г.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	2008	1	93
<i>Ямборко Г.В., Соловійова І.Л.</i> Ефективність різних способів зберігання промислових штамів бактерій роду <i>Lactobacillus</i>	2007	1	53
<i>Яролинский Д.Г.</i> див. <i>Жуковская Л.А.</i>	2008	3	31

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

INFORMATION FOR THE AUTHORS

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

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

Тематична спрямованість: мікробіологія, вірусологія, імунологія, молекулярна біотехнологія, створення та селекція нових штамів мікроорганізмів, мікробні препарати, антимікробні засоби, біосенсори, діагностичні 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: “Оглядів та теоретичні статті”, “Експериментальні праці”, “Дискусії”, “Короткі повідомлення”, “Хроніка наукового життя”, “Сторінки історії”, “Ювілеї і дати”, “Рецензії”, “Книжкова полиця”.

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

До друку приймаються статті (2 примірники) обсягом не більше 8 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди — до 10 стор., рецензії — до 3 стор., короткі повідомлення — до 2 стор.

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



При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

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

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

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

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

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

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

У посиланні пишуть прізвища усіх авторів. В експериментальних працях має бути не більше 15 посилань літературних джерел. Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.



ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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

Глоба Л.І., Подорван Н.І. Біотехнологія очищення забрудненої природної води // *Вісник ОНУ.* — 2001. — т. 6, в. 4. — С. 65 - 67.

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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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



На автореферати дисертацій

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



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

Усі права захищені згідно законодавства України.

Здано до набору 30.11.2008 р. Підписано до друку 18.12.2008 р.
Формат 70X108/16. Друк офсетний. Обл.-вид. арк. 7,75. Ум.-друк. арк. 9,8.
Тираж 300 прим. Зам. № 0812-08.

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