

УДК 579.22+577.15

Т. П. Кілочок, І. В. Жерносекова, О. А. Тимчук, С. Ю. Рожко

Дніпропетровський національний університет

ВПЛИВ ІОНІВ СВИНЦЮ НА БІОСИНТЕТИЧНУ СПРОМОЖНІСТЬ ШТАМУ *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS* 2P-15

Досліджено вплив різних концентрацій іонів свинцю на біосинтетичні властивості штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 – продуцента складного комплексу екстрацелюлярних ферментів і стимулятора росту. Показано, що іони свинцю, які вносились у тверде середовище, стимулюють утворення поверхневого міцелію та спорового посівного матеріалу. Іони свинцю, що вносились до складу рідкого ферментаційного середовища в концентрації 1,0–2,0 мг/л, стимулюють синтез бактеріо- та протеолітичних ферментів, впливаючи на кількісний і якісний склад синтезованих ферментів.

The influence of different concentrations of Pb ions on biosynthetic ability of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15, which is the producer of compound complex of extracellular enzymes and growth stimulators, was studied. It has been showed, that Pb ions introduced in agar medium have had a stimulative effect on production of surface and depth mycelia. The Pb ions, which have been inoculated into liquid fermentative medium in concentration of 1,0–2,0 mg/l realized directed synthesis of bacterio- and proteolytic enzymes, had an influence on qualitative and quantitative composition of produced enzymes.

Вступ

Синтез і секреція позаклітинних ферментів, у тому числі літичних, – процес, який залежить від складу живильного середовища [5; 7]. Виявлення характеру синтезу того чи іншого ферменту дозволяє використовувати одержану інформацію на практиці та розробити такий склад живильного середовища, який дає можливість підвищити продуктивність штамів-продуцентів білогічно-активних речовин [2]. Один із таких регуляторів біосинтетичної активності мікроорганізмів – іони металів, у тому числі й важких [4].

Свинець – мікроелемент, у тій чи іншій мірі необхідний для життєдіяльності мікроорганізмів. У малих концентраціях він підвищує біосинтетичну спроможність мікроорганізмів, а у великих стає токсичним [3].

Мета даної роботи – виявити вплив різних концентрацій іонів свинцю у складі твердого та рідкого ферментаційного середовища на біосинтетичну спроможність штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – штам *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 – продуцент складного комплексу гідролітичних ферментів і стимулятора росту неферментної природи.

Глибинне вирощування штаму 2P-15 проводили в колбах ємністю 500 мл (по 50 мл живильного середовища) при 220 об./хвилину протягом 72 годин на середовищі наступного складу (у %): соєве борошно – 0,6; NH_4NO_3 – 0,152; K_2HPO_4 – 0,027; глюкоза – 1,18; $CaCO_3$ – 0,42; $CaCl_2$ – 0,2; $FeSO_4$ – 0,005; $MgCl_2$ – 0,056; $ZnSO_4$ – 0,00002; $MnCl_2$ – 0,0015; pH – 8,0.

Для вивчення впливу на ростові показники та ензиматичну активність розчин свинцю вносили додатково перед стерилізацією в тверде середовище Гаузе та ферментаційне середовище в концентраціях 0,10, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 мг/л.

На середовищі Гаузе ріст стрептоміцету аналізували протягом 10 діб. Його оцінювали за п'ятибальною шкалою: «+++» – інтенсивний ріст (суцільний ріст із по-

© Т. П. Кілочок, І. В. Жерносекова, О. А. Тимчук, С. Ю. Рожко, 2006

верхневим міцелієм по всій поверхні середовища); «++» – помірний ріст; «+» – слабкий ріст; «+–» – дуже слабкий ріст; «–» – ріст відсутній. При глибинному культивуванні біомасу аналізували ваговим методом. Продуктивність штаму 2P-15 розраховували відношенням літичної активності в од./мл до біомаси мг/мл. Концентрацію білка визначали спектрофотометрично [6]. Ензиматичну активність – турбодиметричним методом: бактеріолітичну за [8], протеолітичну за [1].

Фракціонування культуральної рідини (об'єм 5 мл) проводили на колонці (об'єм 16 см³) із сефодексом G-100. Елюцію здійснювали 0,02 М ацетатним буфером (pH – 5,6), фракції збирали по 3 мл. Швидкість елюції 12 мл/годину. У фракціях визначали білковий профіль і бактеріолітичну активність відносно інтактних клітин *Staphylococcus aureus*, *M. lysodeikticus*.

Результати та їх обговорення

Результати досліджень впливу різних концентрацій свинцю на ріст стрептоміцету при культивуванні на твердому середовищі Гаузе свідчать, що порівняно з контролем концентрації $Pb(NO_3)_2$ 0,25, 0,50 та 4,00 мг/мл сприяють формуванню як субстратного, так і повітряного міцелію, починаючи з третьої доби вирощування (табл.).

Таблиця

Ріст штаму на агаризованому середовищі у присутності іонів свинцю

Час інкубації стрептоміцету, годин	Контроль (без додавання свинцю)	Концентрація іонів свинцю, мг/л					
		0,10	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00
72	–	–	+	+	–	–	+
96	+	+-	+	+	+-	+-	+
120	+	+	++	++	+	+	++
144	+	++	+++	+++	++	++	+++
168	++	++	+++	+++	++	+++	+++
192	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
216	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Нами досліджено вплив іонів Pb^{2+} , які додавалися до твердого середовища (середовище Гаузе), з подальшим культивуванням на рідкому ферментаційному середовищі на біосинтетичну спроможність штаму 2P-15. Встановлено, що накопичення біомаси практично не змінюється при дослідженні всіх концентрацій свинцю. Щодо білка, то спостерігається невелике збільшення його виділення (з 10 до 15 %) при концентраціях 1,0, 2,0 та 4,0 мг/л, що, можливо, пов'язано з направленим біосинтезом лізоензимів.

Досліджено вплив іонів свинцю на бактеріолітичну активність і продуктивність штаму відносно інтактних клітин *S. aureus* (рис. 1) і *M. lysodeikticus* (рис. 2). Максимальний рівень біосинтезу стафілолізину, у тому числі й продуктивність штаму 2P-15, підвищується у два рази при концентрації свинцю 1 мг/л; концентрації 2,0 та 4,0 мг/л пригнічують біосинтез стафілолізину, продуктивність знижується удвічі. Щодо клітин *M. lysodeikticus*, то, як видно з рис. 2, максимальний рівень біосинтезу лізоензимів і продуктивність штаму спостерігаються при концентрації 2,0, 4,0 мг/л (зростає у три рази), що не співпадає з максимальним рівнем біосинтезу стафілолітичних ензимів. При аналізі впливу іонів свинцю на протеолітичну активність і продуктивність штаму 2P-15 (рис. 3) встановлено, що вихід протеїназ спостерігається як при низьких, так і при високих концентраціях свинцю (на 53–62 % вище, ніж у контролі).

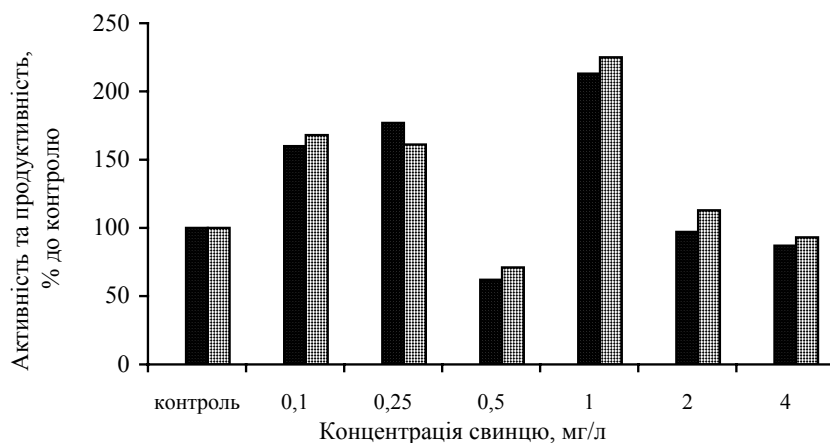


Рис. 1. Вплив іонів свинцю на стафілолітичну активність і продуктивність штаму 2P-15:

■ – бактеріолітична активність; ▨ – продуктивність.

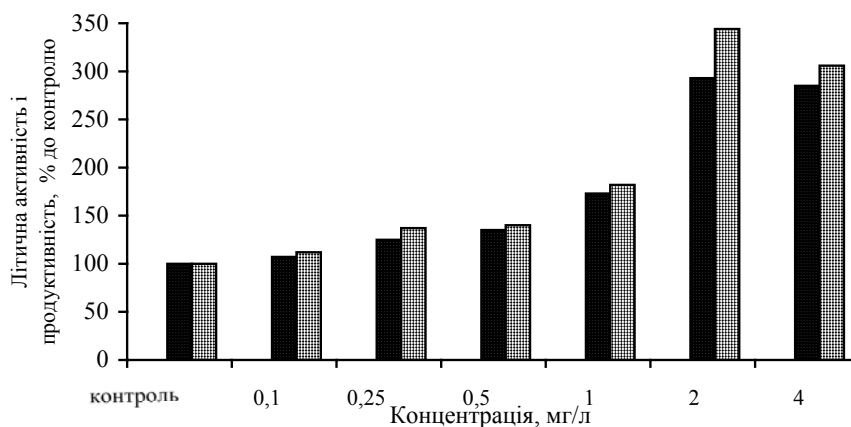


Рис. 2. Вплив іонів свинцю на бактеріолітичну активність і продуктивність штаму 2P-15 відносно мікрокока:

■ – бактеріолітична активність; ▨ – продуктивність.

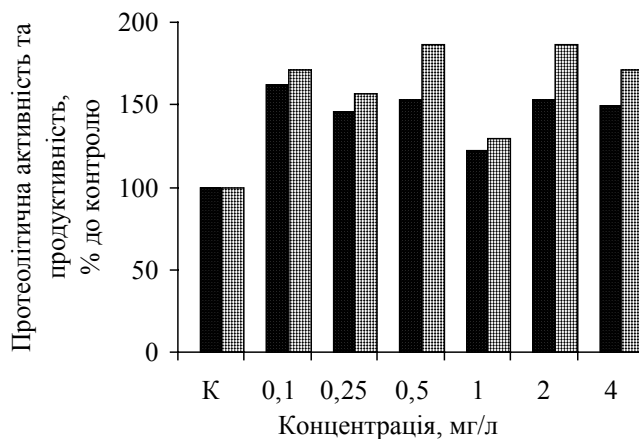


Рис. 3. Вплив різних концентрацій свинцю на протеолітичну активність і продуктивність штаму 2P-15:

■ – протеолітична активність; ▨ – продуктивність.

На наступному етапі досліджено вплив оптимізованої концентрації свинцю (2,0 мг/л) на біосинтез індивідуальних ферментів шляхом подальшої гель-фільтрації культуральної рідини на сефадексі G-100. Установлено, що в процесі елюції контрольного зразка виділяється один великий білковий пік і чотири маленьких. Причому максимальна кількість білка спостерігається від 10-ї до 14-ї фракції. Великий пік складає приблизно 60 % від загального елюйованого білка, він характеризується невисоким рівнем бактеріолітичної активності. Основна маса літично активних ензимів зосереджена у фракціях від 1-ї до 10-ї і характеризується низькими концентраціями високомолекулярних білків. Виявлено, що кількість піків, відповідних стафілолітичній активності, дорівнює восьми, з яких три відповідають високомолекулярним білкам, а інші – низькомолекулярним. Що стосується бактеріолітичної активності відносно *M. lysodeikticus*, то тут виявлено шість піків, з яких два з'являються у фракціях 1–8 і представлені високомолекулярними білками. Третій пік співпадає з максимальним білковим піком. Останні три піки пов'язані з фракціями низькомолекулярних білків і характеризуються низькими рівнями бактеріолітичної активності.

При фракціонуванні дослідного зразка встановлено, що загальна кількість елюйованого білка збільшується: зростає кількість високомолекулярних білків (від 1-ї до 5-ї фракції) у чотири рази, які співпадають із піками високої бактеріолітичної активності відносно інтактних клітин *S. aureus* і *M. lysodeikticus*; підвищується також кількість білків у фракціях з 6-ї по 15-у порівняно з контролем, що сприяє підвищенню бактеріолітичної активності.

Виявлено також пік бактеріолітичної активності у фракціях 7–10, який не пов'язаний із максимальним виходом білка, що співпадає з контролем, але відрізняється за рівнем активності. З'являється допоміжний пік літичної активності відносно *M. lysodeikticus* у фракціях 8–11, який перекриває піки максимальної концентрації білка, що не співпадає з контролем і може свідчити про індукцію синтезу глікозидаз іонами свинцю. Щодо низькомолекулярних білків, то вони виходять у фракціях 17–30; їх загальна кількість на 15–20 % вища порівняно з контролем; вони характеризуються появою двох піків літичної активності відносно клітин *M. lysodeikticus* і чотирма невеликими піками стафілолітичної активності.

Висновки

Іони свинцю, які додавалися до твердого та рідкого середовищ, у концентрації 1,0–2,0 мл/г підвищують продуктивність штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 відносно клітин *S. aureus*, *M. lysodeikticus* і протеолітичну активність у 2,0–3,5 рази. Методом фракціонування на сефадексі G-100 встановлено, що додавання іонів свинцю в концентрації 2,0 мг/л сприяє спрямованому синтезу індивідуальних ферментів, які розчиняють клітинні стінки *M. lysodeikticus*.

Отримані результати мають як теоретичне, так і практичне значення й можуть застосовуватись при одержанні ферментних препаратів із направленим спектром дії в дослідно-промислових умовах.

Бібліографічні посилання

1. Авиженис В. Ю. Некоторые свойства протеолитических ферментов препарата “Оризин ПК” / В. Ю. Авиженис, И. М. Савицкайте // Труды АН ЛитССР. Сер. В. – 1969. – Т. 49, № 2. – С. 181–191.
2. Бабенко Ю. С. Роль некоторых микроэлементов в создании лизоэнзимных препаратов медицинского назначения / Ю. С. Бабенко, Т. П. Килочек, И. Е. Соколова // Микроб. журн. – 1997. – С. 6–7.

3. **Валагурова О. В.** Вплив тяжких металів на угруповання стрептоміцетів сірого опідзоленого ґрунту / О. В. Валагурова, В. С. Козирицька // Мікробіологічний журнал. – 1996. – Т. 58, № 2. – С. 16–22.
4. **Вплив** важких металів на біосинтез, активність літичних ферментів і ристимулювального фактора у *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* П-29 / Т. П. Кілочок, І. Є. Соколова, Н. П. Черногор та ін. // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2005. – Вип. 13, т. 1. – С. 108–113.
5. **Оптимизация биосинтеза** литических ферментов термотолерантным актиномицетом *Streptomyces griseus* 11-84 / Н. П. Петрова, Н. М. Павлова, Є. А. Шишкова и др. // Мікроб. журн. – 2002. – № 1. – С. 28–35.
6. **Практикум** по физиологии растений // Под ред. Н. Н. Третьякова. – М.: Агропромиздат, 1990. – С. 177–179.
7. **Чистякова Т. Н.** Ингибирование роста *Candida valida* катионами магния, цинка, железа / Т. Н. Чистякова, Э. П. Дедюхина, В. К. Ерошин // Микробиология. – 1981. – Т. 60, № 1. – С. 48–54.
8. **Pat. 3649454 USA**, C 12 K 1/06. Bacteriolytic enzyme and process for the production thereof / M. Isono, T. Takahachi, Y. Yamadzeki. – Publ. 10.04.72.

Надійшла до редколегії 03.01.06.

УДК 597:591.5 (282.247.326.6)

В. М. Кочет

Дніпропетровський національний університет

ВИДОВИЙ СКЛАД ФАУНИ РИБ р. САМАРА НА СУЧАСНОМУ ЕТАПІ ІСНУВАННЯ ІХТІОЦЕНОЗУ

Уперше подається повний видовий список риб р. Самара Дніпровська згідно із сучасною номенклатурою. Список складено на базі 25-річного періоду обстеження іхтіофауни ріки з урахуванням стану угруповань риб усіх типів біотопів, представлених на її акваторії. Наведено причини, що обумовили динаміку видового складу іхтіофауни з моменту перших досліджень.

Complete fish list of Samara Dniprovsk River is presented in the paper. The List is formed on the base of 25 years of the ichthyofauna study and taking into account the fish communities state in all types of biotopes. Reasons influenced on the dynamics of fish species composition since the first study are put forward.

Вступ

Ріка Самара – лівобережна притока першого порядку р. Дніпро. В адміністративному відношенні протікає по території трьох областей: Донецької, Харківської та Дніпропетровської. Площа басейну р. Самара складає 6500 км² (без урахування басейну р. Вовча), довжина – 311 км [6].

У гідроекологічному відношенні ріка розподіляється на дві ділянки:

а) річкова екосистема (від витоків до дамби у с. Новоселівка);

б) водосховищна екосистема (нижче дамби у с. Новоселівка до Усть-Самарського мосту).

Остання має всі характеристики, притаманні штучно створеним водоймам, і перебуває під формівним впливом Дніпровського водосховища. По суті Самарська затока (нижня течія ріки) – частина Дніпровського водосховища, створена в 1933–1934 рр. при заповненні устя Самари. Після руйнування греблі ДніпроГЕСу (1941 р.)

© В. М. Кочет, 2006