

УДК 579.871.1+577.151.04

Фуртат І. М., Пастиря А. С., Наваліхіна А. Г.

ПІДБІР ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КАТАЛАЗНОЇ АКТИВНОСТІ ІНТАКТНИХ КЛІТИН НЕПАТОГЕННИХ КОРИНЕБАКТЕРІЙ

Досліджено вплив складу буферних розчинів та реакційної суміші на визначення каталазної активності інтактних клітин *Corynebacterium ammoniagenes* УКМ Ас-732^T, *Corynebacterium flavescens* УКМ Ас-611^T та *Corynebacterium variabile* УКМ Ас-717^T. Показано, що при визначенні каталазної активності штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732^T склад досліджених буферних розчинів не відіграє суттєвої ролі, оскільки статистично значимої різниці між показниками цієї активності встановлено не було. У штамів *C. variabile* УКМ Ас-717^T і *C. flavescens* УКМ Ас-611^T статистично достовірні вищі показники каталазної активності виявлено за умови використання Na-фосфатного та K-фосфатного буферних розчинів, порівняно з трис-НСІ і Na-цитратним. Встановлено також, що для визначення каталазної активності інтактних клітин коринебактерій є недоцільним використання ЕДТА, оскільки наявність цього детергента у реакційній суміші призводить до зниження показників ферментативної активності у всіх досліджених штамів коринебактерій.

Ключові слова: каталазна активність, непатогенні коринебактерії, оптимальні умови, йонний склад буферних розчинів.

Вступ

На сьогодні каталази описані у широкого кола бактерій, зокрема грамнегативних (*Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Brucella abortus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*), грампозитивних (*Bacillus firmus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Deinococcus radiodurans*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus simulans*), фототрофних бактерій, мікобактерій (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*), галофільних архебактерій (*Halobacterium halobium*) та стрептоміцетів (*Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces venezuelae*) [1–7]. Наразі існує два основних підходи до визначення каталазної активності мікроорганізмів, а саме: дослідження активності очищеного ферменту [5; 6] і вивчення каталазної активності інтактних клітин [7–9]. Окрім того, переважна більшість досліджень засвідчує, що значення каталазної активності залежить також від рН бу-

ферного розчину, у якому проводять реакцію. Тому визначення каталазної активності у представників різних груп мікроорганізмів зазвичай здійснюють із використанням буферних розчинів, що різняться за своїм складом та значенням рН, оскільки останні мають відповідати оптимальному активності каталази певного виду мікроорганізмів. Зокрема, для дослідження активності очищеного ферменту KatA *Pseudomonas aeruginosa* і *Methanosarcina barkeri* автори використовували трис-НС. буферний розчин з рН 7,8 і 8,0, відповідно [3; 5]. Дуже часто для визначення каталазної активності застосовують калій-фосфатний буферний розчин із різним діапазоном рН, наприклад рН 6,8 у *Helicobacter pylori* [4], рН 7,0 – *Vibrio rumeiensis* [6], рН 7,2–7,4 – *Escherichia coli* [7; 9]. Втім вплив хімічного складу буферних розчинів та реакційної суміші на ефективність визначення каталазної активності інтактних клітин актинобактерій і досі вивчений недостатньо. З огляду на викладене вище, метою роботи було дослідити вплив йонного складу бу-

ферних розчинів і підібрати оптимальні умови для визначення каталазної активності інтактних клітин у деяких представників непатогенних видів роду *Corynebacterium*. Вибір штамів у дослідженні обумовлений тим, що вони розрізняються за низкою культуральних, фізіолого-біохімічних та хемотаксономічних ознак, зокрема їм властивий аеробний та факультативно-анаеробний типи метаболізму [10–12].

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були штами коринебактерій *Corynebacterium ammoniagenes* УКМ Ас-732^T (АТСС 6871), *Corynebacterium flavescens* УКМ Ас-611^T (ВКМ Ас-1956) та *Corynebacterium variabile* УКМ Ас-717^T (АТСС 15753) (^T – штамп, типовий для виду), отримані з Української колекції мікроорганізмів (УКМ) Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Для підтримання культур та визначення каталазної активності досліджених штамів використовували м'ясопептонний агар (МПА, Мікроген, Росія) із додаванням 2,5 г/л дріжджового екстракту (Himedia, Індія) та 0,1 г/л глюкози й культивували за оптимальних для штамів температур (28° та 30°C) [10–12].

Для виготовлення стандартизованих суспензій клітин добові культури бактерій змивали з поверхні живильного середовища 0,15 М розчином NaCl та центрифугували протягом 15 хв за 8000 об./хв. Для відмивання клітин від залишків середовища отриманий осад ресуспендували у відповідному буферному розчині (рН 7,4) та осаджували клітини шляхом центрифугування за вищеписаних умов. Відмивання проводили двічі, після чого осад знову ресуспендували у відповідному буферному розчині та доводили до необхідного значення оптичної густини (3,3 одиниць МакФарланда, яка відповідає концентрації $1 \cdot 10^9$ клітин/мл). Для визначення кількості клітин у суспензії використовували денситометр для вимірювання оптичної густини DEN-1 (Biosan, Латвія) [13].

Каталазну активність у стандартизованій суспензії інтактних клітин досліджували спектрофотометричним методом (СФ-46, ЛОМО) за довжини хвилі 240 нм за розкладом пероксиду водню [7; 14]. Ферментативну активність визначали у реакційному середовищі об'ємом 3 мл, яке містило 50 мМ певного буферного розчину (рН 7,4), 0,5 мМ ЕДТА (Sigma, США) або без нього, 10 мМ пероксиду водню та 50 мкл суспензії клітин. Для обрахунку вмісту H_2O_2 застосовували коефіцієнт молярної екстинції $39,4 (M \cdot cm)^{-1}$ [7]. Каталазну активність

виражали у мкмоль/хв на 1 мл стандартизованої суспензії, концентрацією $1 \cdot 10^9$ клітин/мл. Дослідження ферментативної активності проводили за температури 27 °С.

Вибір оптимальних умов для визначення каталазної активності у досліджуваних штамів коринебактерій здійснювали шляхом підбору хімічного складу різних буферів, які у подальшому використовували для виготовлення реакційної суміші. Для цього застосовували 0,05 М К-фосфатний, 0,05 М Na-фосфатний, 0,02 М трис-HCl та 0,02 М Na-цитратний буферні розчини (рН 7,4). До перелічених вище буферних розчинів додавали або ні 0,5 мМ ЕДТА для з'ясування впливу цього детергента на визначення показників каталазної активності.

Для визначення впливу хімічного складу реакційної суміші на каталазну активність штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732^T застосовували критерій Краскала–Уолліса для перевірки наявності різниці між групами, після чого застосовували критерій Дана для множинних порівнянь значень каталазної активності при використанні різних буферних розчинів. Для цього отримані дані ранжували, після чого обчислювали суми рангів та середні ранги для кожної із груп. Загальний середній ранг обраховували за формулою (1), де N – загальна кількість отриманих даних, після чого за формулою (2) визначали величину D [15]:

$$R = \frac{1+2+\dots+N}{N} = \frac{N+1}{2}, \quad (1)$$

$$D = n_1 (\bar{R}_1 - \bar{R})^2 + n_2 (\bar{R}_2 - \bar{R})^2 + n_3 (\bar{R}_3 - \bar{R})^2, \quad (2)$$

де: $\bar{R}_1, \bar{R}_2, \bar{R}_3$ – середні ранги груп, n_1, n_2 та n_3 – чисельність груп, \bar{R} – загальний середній ранг.

Критерій Краскала–Уолліса обчислювали за формулою (3):

$$H = \frac{D}{N(N+1)/12}. \quad (3)$$

Критичні значення критерію Краскала–Уолліса дорівнювали 7,82 та 11,35 для рівнів значущості 0,05 та 0,01 відповідно (для кількості порівнюваних груп 8 і відповідної кількості ступенів свободи $v = 7$). При значеннях критерію, що були вищими критичних, виявляли різницю між групами [15].

Для порівняння груп між собою застосовували критерій Дана. Критерій обчислювали за формулою T (4), де \bar{R}_A та \bar{R}_B – середні ранги порівнюваних груп, n_A та n_B – їх чисельність, N – чисельність сукупності.

$$Q = \frac{\bar{R}_A - \bar{R}_B}{\sqrt{\frac{N(N+1)}{12} \left(\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B} \right)}} \quad (4)$$

Критичні значення критерію Дана дорівнюють 3,12 та 3,57 двох рівнів значущості, відповідно, 0,05 та 0,01 для кількості порівнюваних груп $k = 8$ при порівнянні даних щодо впливу додавання ЕДТА, та 2,63 і 3,14 для $k = 4$ при порівнянні різних буферних розчинів [15].

Для додаткової статистичної перевірки даних, а також для статистичної обробки отриманих результатів визначення показників каталазної активності інтактних клітин штамів *C. variabile* УКМ Ас-717^T та *C. flavescens* УКМ Ас-611^T використовували більш чутливий до виявлення різниці між двома групами критерій Ст'юдента. З цією метою спочатку розподіл даних перевіряли на нормальність за допомогою критерію Шапіро–Уїлка зважаючи на незначний обсяг певних вибірок, оскільки він дозволяє перевірити вибірки на нормальність із кількістю $n=3$. У випадку, коли досліджувані вибірки розподіляються нормально, для подальшого їх порівняння можна застосовувати параметричні критерії, у тому числі й критерій Ст'юдента [16; 17]. У нашому випадку середні значення вибірок порівнювали за допомогою критерію Ст'юдента відповідно до формули (5) [15–17]:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1}{n} + \frac{S_2}{n}}} \quad (5)$$

де S_1 та S_2 – стандартні відхилення, n – чисельність вибірок, \bar{X}_1 , \bar{X}_2 – середні значення.

Для критерію Ст'юдента критичне значення залежить не лише від рівня значущості, а й від кількості ступенів свободи v . Тому критичні значення критерію Ст'юдента визначали із таблиці, за кількістю ступенів свободи v та заданими рівнями значущості (0,05 та 0,01). Кількість ступенів свободи розраховували за такою формулою (6) [15]:

$$v = 2(n - 1) \quad (6)$$

Критичні значення критерію Ст'юдента для порівняння каталазної активності за різного складу реакційної суміші становили 2,228 та 3,169 за рівнів значущості 0,05 та 0,01 відповідно [15].

Результати дослідження

Відомо, що для дослідження каталаз різних груп бактерій, як правило, застосовують буферні

розчини, що відрізняються між собою хімічним складом, йонною силою та рН. Насамперед це зумовлено індивідуальними характеристиками ферментів, оскільки наразі описані каталази, що виявляють активність у широкому діапазоні оптимуму рН (типові та нетипові монофункціональні каталази, негемові каталази), хоча відомі й рН-залежні каталази-пероксидази із вузьким оптимумом рН [2; 18; 19].

Вплив хімічного складу буферних розчинів (й відповідно реакційної суміші) на визначення показників каталазної активності штамів *Corynebacterium ammoniagenes* УКМ Ас-732^T, *Corynebacterium flavescens* УКМ Ас-611^T і *Corynebacterium variabile* УКМ Ас-717^T вивчали із застосуванням К-фосфатного, Na-фосфатного, Na-цитратного, а також трис-НСІ буферних розчинів за рН 7,4.

Порівняльний аналіз показників каталазної активності інтактних клітин штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732^T дозволив з'ясувати, що йонний склад буферного розчину та реакційної суміші певною мірою впливав на визначення ферментативної активності дослідженого штаму. Так, найвище значення каталазної активності (5369,8 мкМ H_2O_2 /хв $\cdot 10^9$ клітин) виявляли за умови використання Na-фосфатного буферного розчину. При застосуванні інших буферних розчинів для визначення каталазної активності у штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732^T ці показники були дещо нижчими (рис. 1).

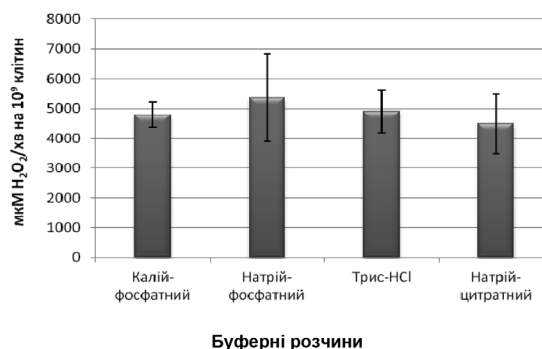


Рис. 1. Вплив хімічного складу буферних розчинів на показники каталазної активності інтактних клітин штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732^T

Зокрема, при використанні К-фосфатного буферного розчину (рН 7,4) показник ферментативної активності становив 4794,1 мкМ H_2O_2 /хв $\cdot 10^9$ клітин (тобто, на 11 % був нижчий, ніж за використання Na-фосфатного буферу). У випадку застосування у реакційній суміші для визначення каталази трис-НСІ і Na-цитратного буферних розчинів цей показник був нижчим на 9 % та 17 % й відповідно стано-

вив 4894,3 і 4483,9 мкМ H_2O_2 /хв · 10⁹ клітин. Статистична обробка отриманих даних із застосуванням критерію Краскала–Уолліса, який є непараметричним аналогом дисперсійного аналізу, дозволила з'ясувати, що виявлена нами різниця між показниками каталазної активності штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732^Т була статистично вірогідною, оскільки значення цього критерію було більшим від критичних і становило $H = 215,1$.

Для подальшого аналізу виявленої різниці між окремими буферними розчинами їх порівнювали попарно, використовуючи критерій Дана. Отримані нами значення критерію Дана були нижчими за критичні, що свідчило про відсутність статистично достовірної різниці між значеннями каталазної активності штаму УКМ Ас-732^Т за умови використання різних буферних розчинів. Отже, це дозволило нам вважати, що хімічний склад буферних розчинів у реакційній суміші під час визначення каталазної активності інтактних клітин штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732^Т не має суттєвого значення, а виявлену різницю під час використання різних буферів у реакційній суміші не можна вважати статистично вірогідною.

На відміну від *C. ammoniagenes*, у штаму *C. variabile* УКМ Ас-717^Т найвищі значення каталазної активності виявляли за умови використання Na-фосфатного буферного розчину (рН 7,4), тоді як у штаму *C. flavescens* УКМ Ас-611^Т – при застосуванні К-фосфатного буферу (рис. 2).

Під час статистичної обробки отриманих результатів із застосуванням критерію Ст'юдента (за рівня значущості $\alpha = 0,01$) було встановлено статистично значиме підвищення показників каталазної активності інтактних клітин штамів *C. variabile* УКМ Ас-717^Т та *C. flavescens* УКМ Ас-611^Т лише за умови використання згаданих вище буферів, порівняно

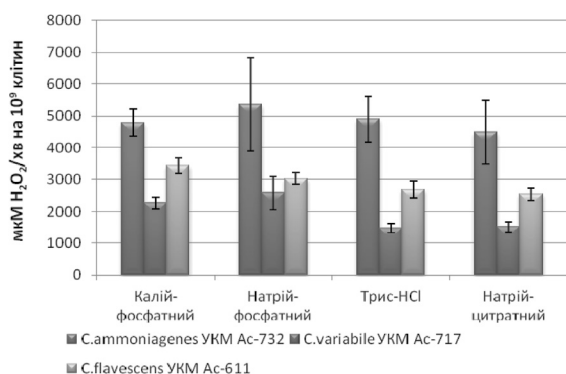


Рис. 2. Вплив хімічного складу буферних розчинів на показники каталазної активності інтактних клітин досліджених штамів коринебактерій

із трис-НС. та Na-цитратним буферними розчинами. Натомість різницю між цими показниками при застосуванні Na-фосфатного і К-фосфатного буферних розчинів статистично доведено не було (табл. 1).

Таблиця 1. Порівняння показників каталазної активності інтактних клітин штамів *C. variabile* УКМ Ас-717^Т і *C. flavescens* УКМ Ас-611^Т за умови використання різних буферних розчинів, мкМ H_2O_2 /хв · 10⁹ клітин

Буферний розчин	<i>C. variabile</i> УКМ Ас-717 ^Т		<i>C. flavescens</i> УКМ Ас-611 ^Т	
	Каталазна активність	Критерій Ст'юдента	Каталазна активність	Критерій Ст'юдента
Na-фосфатний К-фосфатний	2578,25	1,35099	3029,00	3,33342
	2272,98		3432,97	
Na-фосфатний Трис-НСІ	2578,25	4,96996	3029,00	2,63712
	1476,31		2690,35	
Na-фосфатний Na-цитратний	2578,25	4,75808	3029,00	4,66889
	1520,02		2540,89	
К-фосфатний Трис-НСІ	2272,98	8,26845	3432,97	5,16037
	1476,31		2690,35	
К-фосфатний Na-цитратний	2272,98	7,68949	3432,97	7,24795
	1520,02		2540,89	
Трис-НСІ Na-цитратний	1476,31	0,49849	2690,35	1,14795
	1520,02		2540,89	

Відомо, що деякі автори для визначення каталазної активності інтактних клітин бактерій додають до буферних розчинів ЕДТА. Наприклад, цей детергент додавали у реакційну суміш для визначення каталазної активності інтактних клітин *Escherichia coli* для розрихлення клітинної стінки й полегшення виходу ферменту із периплазматичного простору бактерій [7, с. 20]. Водночас більшість авторів, як правило, активність очищених препаратів каталази досліджує, використовуючи буферні розчини без додавання ЕДТА [5; 6].

Враховуючи викладене, на наступному етапі роботи ми вважали за доцільне з'ясувати, чи впливатиме на визначення каталазної активності досліджених штамів коринебактерій внесення у реакційну суміш ЕДТА. У результаті проведених досліджень було показано, що додавання детергента до деяких буферних розчинів призводило до певного зниження показників ферментативної активності. Зокрема, у штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732^Т при використанні К-фосфатного та Na-фосфатного буферних розчинів значення каталазної активності становили 4138,1 і 4280,9 мкМ H_2O_2 /хв · 10⁹ клітин відповідно (рис. 3), тобто були на 14 % й 20 % нижчими, ніж за відсутності ЕДТА.

Проте усі значення критерію Дана за порівняння вибірок між собою були меншими, ніж критичні (табл. 2). Отже, виявлену різницю не можна вважати статистично значущою.

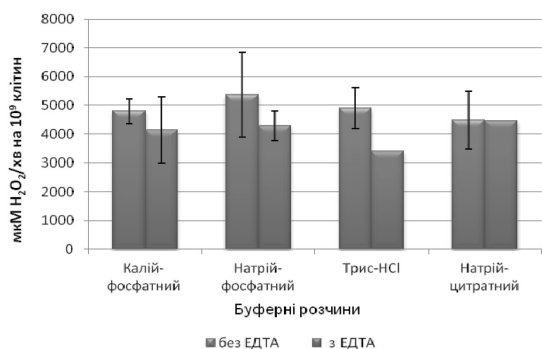


Рис. 3. Каталазна активність інтактних клітин штаму *S. ammoniagenes* УКМ Ас-732^Т за наявності / відсутності у реакційній суміші ЕДТА

Таблиця 2. Вплив хімічного складу буферних розчинів на визначення каталазної активності штаму *S. ammoniagenes* УКМ Ас-732^Т, мкМ Н₂О₂/хв · /10⁹ клітин

Буферний розчин	Каталазна активність				Критерій Дана (Q)
	Без додавання ЕДТА	N	Із додаванням ЕДТА	N	
К-фосфатний	4794,1	6	4138,1	25	1,39
Na-фосфатний	5369,8	17	4280,9	6	1,72
Трис-НСІ	4894,3	4	3405,3	1	1,22
Na-цитратний	4483,9	5	4462,8	1	0,02

Порівняльне визначення каталазної активності інтактних клітин штамів *S. variable* УКМ Ас-717^Т та *S. flavescens* УКМ Ас-611^Т у досліджених буферних розчинах із додаванням ЕДТА та без нього дозволило встановити, що внесення детергента у деякі буферні розчини призводило до зниження каталазної активності в обох згаданих штамів (рис. 4, 5). Так, за наявності ЕДТА у калій-фосфатному та натрій-фосфатному буферних розчинах спостерігали тенденцію до зниження показників каталазної активності.

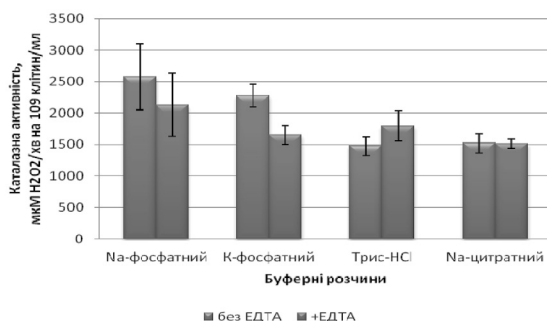


Рис. 4. Каталазна активність інтактних клітин штаму *S. variable* УКМ Ас-717^Т за наявності / відсутності у реакційній суміші ЕДТА

Додавання ЕДТА у Na-цитратний буферний розчин жодним чином не впливало на показники каталазної активності штаму *S. variable* УКМ Ас-717^Т (рис. 4). Натомість, присутність детергента у трис-НСІ буфері у цього штаму призвело до протилежної залежності, а саме – до незначного підвищення ферментативної активності з 1476,31 до 1796,39 мкМ Н₂О₂/хв · 10⁹ клітин (табл. 3).

Таблиця 3. Вплив хімічного складу буферних розчинів на визначення каталазної активності інтактних клітин штаму *S. variable* УКМ Ас-717^Т, мкМ Н₂О₂/хв · /10⁹ клітин

Буферний розчин	Каталазна активність				Критерій Ст'юдента
	Без додавання ЕДТА	N	Із додаванням ЕДТА	N	
Натрій-фосфатний	2578,26	6	2131,28	6	1,517898
Калій-фосфатний	2272,98	6	1652,09	6	6,349597
Трис-НСІ	1476,31	6	1796,39	6	2,787386
Натрій-цитратний	1520,02	6	1514,38	6	0,080978

Наявність ЕДТА у реакційній суміші на основі Na-фосфатного буферу не впливала на визначення каталазної активності інтактних клітин штаму *S. flavescens* УКМ Ас-611^Т (рис. 5).

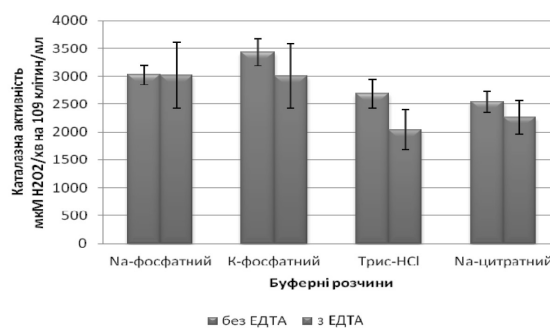


Рис. 5. Каталазна активність інтактних клітин штаму *S. flavescens* УКМ Ас-611^Т за наявності / відсутності у реакційній суміші ЕДТА

Утім за умови внесення детергента до інших буферних розчинів, досліджених у роботі, спостерігали незначне зниження ферментативної активності. Причому найяскравіше ця тенденція проявлялася при застосуванні трис-НСІ буферного розчину (табл. 4). Зокрема, каталазна активність інтактних клітин штаму *S. flavescens* УКМ Ас-611^Т за умови застосування ЕДТА становила 2041,7 мкМ Н₂О₂/хв · 10⁹ клітин, а без внесення детергента у реакційну суміш – 2690,36 мкМ Н₂О₂/хв · 10⁹ клітин.

Таблиця 4. Вплив хімічного складу буферних розчинів на визначення каталазної активності інтактних клітин штаму *C. flavescentis* УКМ Ас-611^Т, мкМ Н₂О₂/хв · 10⁹ клітин

Буферний розчин	Каталазна активність				Критерій Ст'юдента
	Без додавання ЕДТА	N	Із додаванням ЕДТА	N	
Натрій-фосфатний	3029,00	6	3016,07	6	0,051024
Калій-фосфатний	3432,98	6	3006,91	6	1,673279
Трис-НСІ	2690,36	6	2041,74	6	3,610982
Натрій цитратний	2540,81	6	2270,16	6	1,852605

Статистична обробка отриманих результатів із застосуванням критерію Ст'юдента для порівняння середніх значень вибірок дала змогу встановити, що зниження показників каталазної активності інтактних клітин у штаму *C. variabile* УКМ Ас-717^Т за умови додавання ЕДТА у К-фосфатний буфер та штаму *C. flavescentis* УКМ Ас-611^Т при застосуванні трис-НС. буферного розчину було статистично вірогідним. Натомість зниження каталазної активності у цих культур за умови додавання детергенту до інших буферних розчинів було статистично незначущим для обох досліджених штамів коринебактерій (табл. 3, 4).

Висновки

Таким чином, унаслідок проведених досліджень нами було встановлено, що хімічний

склад реакційної суміші суттєво не впливає на показники каталазної активності штаму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732^Т. Утім найвищі значення згаданої ферментативної активності у цього штаму виявляли за використання На-фосфатного буферного розчину без додавання ЕДТА (5369,8 мкМ Н₂О₂/хв · 10⁹ клітин). Більш суттєво, порівняно зі штамом *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732^Т, хімічний склад буферних розчинів впливає на визначення показників каталазної активності штамів *C. variabile* УКМ Ас-717^Т і *C. flavescentis* УКМ Ас-611^Т. Статистично достовірне підвищення ферментативної активності у штаму *C. variabile* УКМ Ас-717^Т було виявлено за умови використання На-фосфатного, а у штаму *C. flavescentis* УКМ Ас-611^Т – К-фосфатного буферних розчинів, порівняно з трис-НС. і На-цитратним.

Одержані результати також засвідчують, що при вивченні каталазної активності інтактних клітин непатогенних коринебактерій не варто застосовувати ЕДТА, оскільки його наявність, як правило, супроводжувалась зниженням показників цієї активності.

Отже, для подальшого дослідження каталазної активності представників роду *Corynebacterium* доцільно застосовувати На-фосфатний чи К-фосфатний буферні розчини.

Список літератури

- Loewen P. C. Bacterial catalases / P. C. Loewen // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses. – 1997. – Vol. 34. – P. 273–308.
- Goldberg I. Purification and characterization of a novel type of catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae* / I. Goldberg, A. Hochman // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – № 991. – P. 330–336.
- Ma J. F. Bacterioferritin a modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa* / J. F. Ma, U. A. Ochsner, M. G. Klotz // Journal of Bacteriology. – 2003. – Vol. 181, № 12. – P. 3730–3742.
- Bauerfeind P. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH / P. Bauerfeind, R. Garner, B. E. Dunn // Gut. – 1997. – Vol. 40. – P. 25–30.
- Shima S. Purification, characterization, and primary structure of a monofunctional catalase from *Methanosarcina barkeri* / S. Shima, A. Netrusov // Arch. Microbiol. – 1999. – Vol. 171. – P. 317–323.
- Yumoto I. Purification and characterization of a catalase from the facultatively psychrophilic bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1T exhibiting high catalase activity / I. Yumoto, D. Ichiashi // Journal of Bacteriology. – 2000. – Vol. 182, № 7. – P. 1903–1909.
- Семчишин Г. М. Вплив руйнування клітин *Escherichia coli* на каталітичні властивості каталази / Г. М. Семчишин, М. В. Дильовий, А. О. Клименко // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т. 72, № 1. – С. 24–28.
- Смирнова Г. В. Роль антиоксидантних систем в отклике бактерий *Escherichia coli* на действие ацетиамидофенола и антибиотиков / Г. В. Смирнова, О. А. Торхова, О. Н. Октябрьский // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 2. – С. 149–156.
- Семчишин Г. Участие регулона soxRS в ответе *Escherichia coli* на окислительный стресс, индуцированный перекисью водорода / Г. Семчишин, Т. Багнокова, В. Луцка // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 11. – С. 1506–1513.
- Collins M. D. Transfer of *Brevibacterium ammoniagenes* (Cooke and Keith) to the Genus *Corynebacterium* as *Corynebacterium ammoniagenes* comb. nov. / M. D. Collins // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1987. – Vol. 37, № 4. – P. 442–443.
- Barksdale L. Biological and chemical basis for the reclassification of *Microbacterium flavum* Orla – Jensen as *Corynebacterium flavescentis* nom. nov. / L. Barksdale, M.-A. Langelle, M. C. Pollice // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1979. – Vol. 29, № 3. – P. 222–223.
- Collins M. D. Transfer of *Arthrobacter variabilis* (Muller) to the Genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium variabilis* comb. nov. / M. D. Collins // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1987. – Vol. 37, № 3. – P. 287–288.
- McFarland J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines / J. McFarland, M. D. Jama // J. Assoc. Off. Anal. Chem. – 1907. – Vol. 49, № 14. – P. 1176–1178.
- Beers R. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase / R. Beers, I. Sizer // J. Biol. Chem. – 1952. – Vol. 195. – P. 133–140.

15. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – Москва : Практика, 1998. – С. 81–119.
16. Shapiro S. S. An analysis of variance test for normality (complete samples) / S. S. Shapiro, M. B. Wilk // *Biometrika*. – 1965. – Vol. 52, № 3, 4. – P. 591–611.
17. <http://sdittami.altervista.org/shapirotest/ShapiroTest.html>. – Shapiro-Wilk Normality Test Online version implemented by Simon Dittami (2009).
18. Loewen P. C. Purification and characterization of catalase-I from *Bacillus subtilis* / P. C. Loewen, J. Switala // *Biochemistry of cell biology*. – 1987. – Vol. 65. – P. 939–947.
19. Singh R. Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs) / R. Singh, B. Wiseman, T. Deemagarn // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2008. – Vol. 471. – P. 207–214.
20. Семчишин Г. М. Вплив протонифору 2,4-динітрофенолу на активність каталази інтактних бактерій *Escherichia coli* / Г. М. Семчишин, В. І. Лушак // *Укр. біохім. журнал*. – 2004. – Т. 76, № 3. – С. 42–48.

I. Furtat, A. Pastyria, A. Navalihina

SELECTION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR DETERMINING CATALASE ACTIVITY IN INTACT CELLS OF NON-PATHOGENIC CORYNEBACTERIA

*The influence of the buffer solution and the reaction mixture on the determination of catalase activity in intact cells of *Corynebacterium ammoniagenes* UC. Ac-732T, *Corynebacterium flavescens* UC. Ac-611T, and *Corynebacterium variabile* UC. Ac-717T was investigated. It was shown that composition of studied buffer solutions has no significant effect on catalase activity of the strain *C. ammoniagenes* UC. Ac-732T since no statistically significant difference between the values of this activity has been found. In strains of *C. variabile* UC. Ac-717T and *C. flavescens* UC. Ac-611T statistically significant higher rates of catalase activity was revealed using the Na-K-phosphate and phosphate buffer solutions compared with Tris-HCl and Na-citrate. It was also established that using of EDTA in the determination of catalase activity in corynebacteria intact cells is unreasonable since the presence of detergent in the reaction mixture leads to decline of enzyme activity in all investigated strains of corynebacteria.*

Keywords: catalase activity, non-pathogenic corynebacteria, optimal conditions, ion composition of buffer solutions.

Матеріал надійшов 17.06.2013

УДК 575.21:575.22+577.218

Дученко А. І., Лизогуб О. Ю., Антонюк М. З., Терновська Т. К.

ПОЛІМОРФІЗМ ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЙ *THINOPYRUM INTERMEDIUM*

*Виявлено значний поліморфізм п'яти природних популяцій *Thinopyrum intermedium* за компонентами спектра високомолекулярних глютенінів та якісними і кількісними ознаками морфології колоса. Встановлені компоненти спектра, за частотами яких різні популяції відрізняються і тому мають маркерне значення для вивчення асоціативної мінливості. За морфологічними ознаками виявлено зв'язок у появі деяких пар якісних ознак та асоціацію між виникненням якісних та кількісних ознак, що може розглядатися як наслідок адаптації рослин до абіотичних факторів довкілля. Взаємозв'язок появи 2-, 3- та 5-го компонентів спектра та форми плеча луски може свідчити про локалізацію на довгому плечі хромосом першої гомеологічної групи хромосом генів морфогенезу колоскової луски.*

Ключові слова: глютеніни, поліморфізм, адаптаційна мінливість, асоційоване спадкування, SDS електрофорез.

© Дученко А. І., Лизогуб О. Ю., Антонюк М. З., Терновська Т. К., 2013