

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

**МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ**  
**MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY**

Науковий журнал  
Виходить 3 рази на рік  
Засновано у липні 2006 року

№ 2(55)  
2022

Одеса  
ОНУ  
2022

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

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

**РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ**  
А. Анадон (Мадрид, Іспанія), Л. Д. Варбанець (Київ, Україна), А. І. Вінніков (Дніпро, Україна),  
Б. М. Галкін (Одеса, Україна), Г. О. Іутинська (Київ, Україна), Л. В. Капрельянц (Одеса, Україна),  
І. К. Курдиш (Київ, Україна), І. П. Метеліцина (Одеса, Україна), Ф. Моцці (Тукуман, Аргентина),  
І. І. Панчук (Чернівці, Україна), М. В. Пати́ка (Київ, Україна), В. С. Підгорський (Київ, Україна),  
Л. М. Сківка (Київ, Україна), Л. Ф. Суходуб (Суми, Україна), Ф. І. Товкач (Київ, Україна),  
Н. Чанішвілі (Тбілісі, Грузія).

**Науковий редактор випуску В. О. Іваниця**

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

**Відповідно до наказу МОН України № 1301 від 15.10.2019 р.**  
**входить до Переліку наукових фахових видань України (категорія «Б»).**

**Видання реферується та індексується в наукометричних базах даних: «Україніка наукова», Index Copernicus Journals Master list, Наукова періодика України (Національна бібліотека України імені В. І. Вернадського), Ulrich's periodicals, Електронний архів-репозитарій Одеського національного університету імені І. І. Мечникова, Наукова періодика України (journal.uran.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Research Bib, Наукова електронна бібліотека e-LIBRARY, IBI Factor**

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

© Одеський національний університет  
імені І. І. Мечникова, 2022

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

**EDITOR-IN-CHIEF**

V. O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

**CO-EDITOR-IN-CHIEF**

T. O. Filipova (Odesa, Ukraine)

**EXECUTIVE SECRETARY**

T. V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

**EDITORIAL BOARD MEMBERS**

A. Anadon (Madrid, Espana), N. Chanishvili (Tbilisi, Geordgia), B. M. Galkin (Odesa, Ukraine),  
G. O. Iutynska (Kyiv, Ukraine), L. V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), I. K. Kurdish (Kyiv, Ukraine),  
I. P. Metelitsyna (Odesa, Ukraine), F. Mozzi (Tucuman, Argentina), I. I. Panchuk (Chernivtsi, Ukraine),  
M. V. Patyka (Kyiv, Ukraine), V. S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine), L. M. Skivka (Kyiv, Ukraine),  
L. F. Sukhodub (Sumy, Ukraine) F. I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L. D. Varbanets (Kyiv, Ukraine),  
A. I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine),

**Scientific editor V. O. Ivanytsia**

*Accepted for publishing articles are reviewed*

Approved for publishing by Academic Council  
of Odesa National Mechnykov University

**According to the order of the Ministry of Education and Science of Ukraine № 1301 from  
15.10.2019 it is included in the List of scientific professional editions of Ukraine  
(category "B").**

**The edition is referenced and indexed in the scientific metric databases: «Ukrainika  
scientific», Index Copernicus Journals Master List, Scientific Periodicals in National  
Library of Ukraine Vernadsky, Ulrich's periodicals, Scientific Periodicals of Ukraine  
(journal.uran.ua), Institutional Repository at Odesa I. I. Mechnykov National University,  
Google Scholar, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Research Bib, e-LIBRARY,  
IBI Factor**

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

Editors: T. V. Ivanytsia, I. V. Raiko

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

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

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

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

© Odesa National Mechnykov  
University, 2022

## ЗМІСТ

### ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

<b>Б.М. Галкін, М.О. Фіногорова, М.Б. Галкін, А.С. Семенець, Т.О. Філіпова</b> БІОСУРФАКТАНТИ МОРСЬКИХ МІКРООРГАНІЗМІВ: ІІІ. ЗАСТОСУВАННЯ У ПРОМИСЛОВИХ ТЕХНОЛОГІЯХ .....	6
---	---

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

<b>І.В. Страшнова, К.С. Потапенко, Н.Ю. Васильєва, Н.В. Коротаєва, І.П. Метеліцина</b> ЧУТЛИВІСТЬ ДО ВАЖКИХ МЕТАЛІВ АКТИНОБАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ БІОЛОГІЧНИХ ОБРОСТАНЬ ЧЕРЕПАШНИКУ І МІДІЙ ОДЕСЬКОЇ ЗАТОКИ ЧОРНОГО МОРЯ .....	19
--	----

<b>С.Я. Комплікєвич, О.Д. Масловська, Н.П. Менів, Н.М. Кулішко, О.Р. Іщак, С.О. Гнатуш</b> ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ <i>CITROBACTER</i> SP. SR35 З ПОРОДНОГО ВІДВАЛУ ВУГІЛЬНОЇ ШАХТИ .....	38
---	----

<b>М.Д. Штеніков, О.Ю. Зінченко, В.В. Болдирєва</b> АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ МОРСЬКИХ БАКТЕРІЙ РОДІВ <i>BACILLUS</i> , <i>PRIESTIA</i> І <i>PAENIBACILLUS</i> РІЗНИХ ТЕРМОТИПІВ .....	50
---	----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ .....	66
---	----

## CONTENTS

### OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

<b>B.M. Galkin, M.O. Finogenova, M.B. Galkin, A.S. Semenets, T.O. Filipova</b> BIOSURFACTANTS OF MARINE MICROORGANISMS: III. APPLICATIONS IN INDUSTRIAL TECHNOLOGIES .....	6
--	---

### EXPERIMENTAL WORKS

<b>I.V. Strashnova, K.S. Potapenko, N.Yu. Vasylieva, N.V. Korotaeva, I.P. Metelitsyna</b> SENSITIVITY TO HEAVY METALS OF ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM THE BIOLOGICAL FOULING OF SHELL ROCK AND MUSSELS OF THE ODESA GULF OF THE BLACK SEA .....	19
<b>S.Y. Komplikevych, O.D. Maslovska, N.P. Meniv, N.M. Kulishko, O.R. Ishchak, S.O. Hnatush</b> ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF BACTERIA <i>CITROBACTER</i> SP. SR35 FROM A COAL MINE WASTE DUMP .....	38
<b>M.D. Shtenikov, O.Y. Zinchenko, V.V. Boldyreva</b> ANTAGONISTIC ACTIVITY OF MARINE BACTERIA OF <i>BACILLUS</i> , <i>PRIESTIA</i> AND <i>PAENIBACILLUS</i> GENERA OF DIFFERENT THERMOTYPES .....	50
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS .....	66

**Б.М. Галкін, М.О. Фіногенова, М.Б. Галкін,  
А.С. Семенець, Т.О. Філіпова**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,  
тел.: +380482635761, e-mail: bgalkin@ukr.net

### **БІОСУРФАКТАНТИ МОРСЬКИХ МІКРООРГАНІЗМІВ: III. ЗАСТОСУВАННЯ У ПРОМИСЛОВИХ ТЕХНОЛОГІЯХ**

*Поверхнево-активні речовини (ПАР) та емульгатори завдяки здатності зменшувати міжфазне натягнення широко використовуються у різних галузях промисловості. Більшість ПАР, що застосовуються сьогодні, виробляється з невідновлюваних нафтохімічних сировинних ресурсів та є небезпечними для живих істот і довкілля. Біосурфактанти (Біо-ПАР) синтезуються мікроорганізмами з відновлюваних сировинних ресурсів, зокрема, з відходів харчової промисловості, є перспективною альтернативою хімічним ПАР завдяки їх біологічній трансформації та екологічності. Перевагами Біо-ПАР, що продукуються представниками морської мікробіоти, є, що вони проявляють свою активність в широкому діапазоні температур, рН та солоності. Показано, що ці біосурфактанти крім поверхнево-активних властивостей часто чинять також інші види активності: антимікробну, протибіоплівкову, антиоксидантну. Встановлено, що біосурфактанти морських мікроорганізмів можуть широко використовуватися у таких галузях, як виробництво засобів гігієни, фармацевтиці, косметології, харчовій промисловості, сільському господарстві, біоремедіації, нафтовидобуванні.*

*Ключові слова: Біосурфактанти, морські мікроорганізми, промислові технології*

Біологічні поверхнево активні речовини (Біо-ПАР) стають важливими продуктами біотехнології для багатьох галузей промисловості, включаючи харчову, косметичну, нафтогазову та фармацевтичну. Доходи на світовому ринку склали 1,5 млрд. дол. США в 2019 році і, за прогнозами, зростатимуть щорічно на 5,5% між 2020 і 2027 роками [1]. Побутові засоби для миття є найбільшим ринком застосування Біо-ПАР, за ними йдуть косметичні вироби і засоби особистої гігієни та вироби харчової промисловості [34]. Серед ключових виробників Біо-ПАР фірми Ecover, Jeneil Biotech, Evonik та Biotensidon (табл. 1). Європа займає понад половину частки ринку використання Біо-ПАР, за нею йдуть США та Азія [34]. Зростаючий світовий інтерес до Біо-ПАР



зумовлений їх низькою токсичністю, здатністю до розкладання, низьким ступенем впливу на навколишнє середовище [8].

Таблиця 1

**Компанії виробники та застосування Біо-ПАР у промисловості [23, 28]**

Table 1

**Companies producing and using Bio-surfactants in industry [23, 28]**

Компанії	Держава	Продукти	Використання у промисловості
AGAE Technologies LLC	США	Рамноліпіди	Фармацевтика, косметика, засоби особистої гігієни, біоремедіація та покращення видобутку нафти
Jeneil Biotech	США	Рамноліпіди	Засоби для очищення, покращення видобутку нафти
Biotensidon	Німеччина	Рамноліпіди	Сільське господарство (боротьба з шкідниками рослин), косметика, засоби для миття і очищення та покращення видобутку нафти
Fraunhofer IGB	Німеччина	Гліколіпіди, мікробні емульгатори	Засоби для миття та очищення (гелі для душу, шампуні, миючі засоби)
Saraya Co. Ltd	Японія	Софороліпіди	Засоби для очищення, косметика, засоби гігієни
Ecover	Бельгія	Софороліпіди	Засоби для очищення, косметика, біомедицина, боротьба зі шкідниками, фармацевтика
Groupe Soliance	Франція	Софороліпіди	Косметика
MG Intobio Co. Ltd	Південна Корея	Софороліпіди	Продукти особистої гігієни
Evonik	Німеччина	Софороліпіди	Продукти для очищення
Lipotec S.A.U	Іспанія	Морські Біо-ПАР	Косметика, особистий догляд
Biopolymer International	Бельгія	Ксантанові та геланові камеді	Харчування, засоби особистої гігієни, фармацевтика, буріння нафтових свердловин, корм для тварин

**Використання Біо-ПАР з морських мікроорганізмів у біоремедіації**

Завдяки своїй здатності до розкладання та низькій екотоксичності Біо-ПАР можуть бути дуже корисними в процесах ремедіації, тому що збільшення видобутку нафти, газу, важких металів та інших необхідних для промисловості продуктів призводить до забруднення навколишнього середовища



та створює зростаючу глобальну стурбованість щодо наземного та морського середовищ [6, 35]. Відповідно до їх фізико-хімічних властивостей Біо-ПАР можна застосовувати не тільки для очищення наземного середовища, але і для водного середовища [38, 39]. Біо-ПАР виступають альтернативою класичним ПАР, що використовуються для рекультивациі [32].

Морські мікроорганізми, такі як *Halomonas*, *Marinobacter*, *Myroides*, а також морські дріжджі *Yarrowia lipolytica* можуть відігравати важливу роль у остаточному видаленні вуглеводнів із забруднених ділянок у результаті виробництва емульгаторів. Завдяки своїм різноманітним структурним і функціональним властивостям вони мають потенційні застосування в процесах біоремедіації. *Halomonas sp.* беруть участь у видаленні розливої нафти шляхом синтезу емульгаторів. Молекули гліколіпідів, що містяться на клітинній поверхні *Halomonas sp.*, підвищують розчинність вуглеводнів і, отже, збільшують їх біодоступність для деградації. Біо-ПАР *Halomonas sp.* може використовуватися для посилення процесів видобутку нафти в екстремальних середовищах [9], оскільки вони є дієвими емульгаторами при низькій температурі [25].

Орнітинові ліпіди, інший тип біоемульгаторів, який синтезується *Myroides sp.* SM1, здатні емульгувати сиру нафту та стабільні у широкому діапазоні температур та рН. Орнітинові ліпіди більш активні ніж синтетичні м'яючі засоби та сурфактин [22]. Емульсан, з *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, може мати потенційне застосування у збільшенні видобування нафти та очищенні розливів нафти [30]. Інші Біо-ПАР теж здатні до біоремедіаційної активності [5]. Біоемульгатор, синтезований бактерією *Alteromonas sp.* 17, яка за сучасної класифікації перейменована на *Marinobacter*, також може бути використана для ефективної деградації вуглеводнів [2]. Бактерія *Marinobacter sp.* M22.20 синтезує фосфоліпопептид, який є ефективним емульгатором. Створені емульсії мають низьку екоотоксичність і емульгують сиру нафту у морській воді [27]. Гліколіпід, виділений з штаму *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644, продемонстрував у 2 рази більшу здатність до солнобілізації сирової нафти, ніж твін 80 [40]. Інший емульгатор "Yansan", синтезований аеробними дріжджами *Yarrowia lipolytica*, показав високу емульгувальну активність та стабільність у діапазоні рН 3–9. Його використовують у рецептурі емульсії, створеної на основі перфторвуглецю, яку застосовують для деградації вуглеводнів [3]. З цією ж метою застосовують Біо-ПАР *Candida lipolytica* [31].

### Використання Біо-ПАР з морських мікроорганізмів у харчовій та косметичній промисловості

Завдяки посиленому використанню стабілізаторів та загусників у харчових продуктах, в цій галузі шукають інгредієнти, які можуть покращити якість та властивості їжі. Гуміарабік, ксантанова камедь і лецитин широко використовуються як гідроколоїдні емульгатори, що стабілізують емульсії олія-у-воді. У продуктах фірми Quorn, суху культуру гриба *Fusarium venenatum* використовують разом з ячним білком, як зв'язувальний компонент. Однак зміна клімату та коливання погоди, такі як посуха, спричинять дефоліацію та впливають на виробництво продуктів на рослинній основі. З метою змен-





шення залежності від синтетичних емульгаторів та рослинних емульгаторів підвищується інтерес до пошуку нових інгредієнтів. На відміну від хімічних поверхнево-активних речовин, Біо-ПАР з морських організмів є нетоксичними і володіють високою стабільністю за екстремальних температур, рН та солоності. Більшість Біо-ПАР з морських мікроорганізмів є експериментальними речовинами з потенціалом застосування у складі харчових та косметичних продуктів. Єдиним комерціалізованим мікробним емульгатором є Емульсан, що продукується *A. calcoaceticus* [30]. За рахунок стабілізації емульсії покращується консистенція та аромат продуктів. Включення Біо-ПАР покращує реологію тіста, збільшує об'єм та емульгує жир і, таким чином, знаходить корисне застосування у хлібопекарській та м'ясопереробній промисловості. Стабілізатор емульсії глюкопротеїд, який був виділений з морської *Antarctobacter* sp. TG22, утворює стабільні емульсії олія-у-воді з комерційними харчовими оліями [12]. Два інших глюкопротеїнових емульгатора з штамів *Halomonas* sp. TG39 і TG67 за властивостями не відрізняються від комерційних емульгаторів. Крім того, їх емульгувальна активність зберігається також в кислих умовах та при високих температурах [13].

Ліпопептид MSA31, виділений з морського мікроорганізму *Nesterenkonia* sp. є ефективним емульгатором, що володіє високою антиоксидантною активністю, а його додавання до кексів покращує м'якість і зберігає якість їжі. Ліпопептид MSA31 ефективно (на 90%) знижує масу біоплівки, що утворюється золотистим стафілококом на поверхні харчових продуктів, і не є токсичним до креветок [18]. Біоемульгатор, синтезований морською бактерією *Enterobacter cloacae*, сприяє в'язкості кислих харчових продуктів [15]. У харчовій промисловості існує широка сфера застосування морських похідних Біо-ПАР як емульгаторів, стабілізуювальних речовин, антимікробних та антиадгезивних антибіотиків (табл. 2).

Хімічні речовини, що використовуються в косметичних засобах, часто викликають подразнення шкіри та алергію. Серед споживачів існує значний інтерес до натуральних косметичних продуктів. Заміна синтетичних ПАР в них на Біо-ПАР може зменшити такий шкідливий вплив. Поверхнево-активні властивості є важливими для визначення типу та кількості Біо-ПАР у миючих, косметичних, фармацевтичних та інших галузях промисловості. Тип сполуки Біо-ПАР, що включається у косметичні засоби, можуть бути обрані на основі їх емульгувальної активності та/або поверхневої активності. Існують такі показники, як гідрофільно-ліпофільний баланс (ГЛБ) та критична концентрація міцел (ККМ), відповідно. ГЛБ визначає полярність Біо-ПАР, що вказує на його розчинність у різних системах. Біо-ПАР з високим значенням ГЛБ є високо гідрофільними, тоді як низьке значення ГЛБ вказує на виражені ліпофільні властивості. На підставі значень ГЛБ можливо прогнозувати сферу їх застосування як емульгаторів, протипінних агентів або зволожувачів. Ці властивості Біо-ПАР необхідні для косметичних продуктів [38].

ККМ – це мінімальна концентрація Біо-ПАР, яка необхідна для зниження поверхневого натягу води. Вони утворюють міцели, які і зменшують поверхневий та міжфазний натяги. Властивості Біо-ПАР визначаються довжиною бічного ланцюга, ненасиченими зв'язками та розміром гідрофільної



Таблиця 2  
Table 2Використання Біо-ПАР з морських мікроорганізмів у косметичних продуктах  
Use of Biosurfactants from marine microorganisms in cosmetic products

Мікроорганізм	Метод ідентифікації	Тип Біо-ПАР	Використання	Концентрація	Методи визначення *	Посилання
<i>Antarctobacter</i> sp. TG22	16SrPHK	Глікопротеїн	Стабілізатор емульсій	21,1 мг/л	ЯМР, ВЕРХ, ГХ	[12]
<i>Halomonas</i> TG39 і TG67	16SrPHK	Глікопротеїн	Емульгування та стабілізація харчових олій	131,0 мг/л TG39, 28,0 мг/л TG67	ЯМР, ВЕРХ, ГХ	[13]
<i>Nesterenkonia</i> species MSA31	16SrPHK	Ліпопеп-тид	Стабілізатор емульсій, антибіоплівковий агент, антиоксидант	Не вказано	ГХ-МС, ТШХ, ЯМР, ІЧФС	[18]
<i>Enterobacter cloacae</i>	АПІ*	Екзополіукрид EPS 71a	Емульгувальний засіб харчових продуктів	Не вказано	Структура не визначена	[15]
<i>Nocardopsis VITSISB</i>	–	Не визначений	Компонент зубної пасти	Не вказано	Структура не визначена	[7]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> BD5	16SrPHK	Ліпопептид	Активність проти меланоми	10 мг/л	ЗВЕРХ, МАЛДІ-МС	[16]

Примітка: \*АПІ – аналітичний профільний індекс; ЯМР – ядерно-магнітна резонансна спектроскопія; ВЕРХ – високоєфективна рідинна хроматографія; ГХ – газова хроматографія; ТШХ – тонкошарова хроматографія; ГХ-МС – комплекс газової хроматографії з мас-спектрометрією; ЗВЕРХ – звернено фазова високоєфективна рідинна хроматографія; МАЛДІ – матрично-активована лазерна десорбція/іонізація; ІЧФС – інфрачервона Фур'є спектроскопія

Note: \*API – analytical profile index, NMR – nuclear magnetic resonance, HPLC – high performance liquid chromatography, GC – gas chromatography, TLC – thin-layer chromatography, GC-MS – gas chromatography coupled with mass spectrometry, RP-HPLC – reversed-phase high-performance liquid chromatography, MALDI – matrix-activated laser desorption/ionization, FTIR – Fourier transform infrared spectrometry



групи. За збільшення гідрофобності молекул Біо-ПАР ККМ має тенденцію до зменшення. Це означає, що потрібна менша концентрація Біо-ПАР для утворення міцел. *Burkholderia thailandensis*, що синтезує рамноліпіди Rha-Rha-C14-C14, має ККМ  $225 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$  порівняно з *P. aeruginosa* PG201, що синтезує Rha-Rha-C10-C10 –  $600 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$ . Завдяки гідрофобності довших ланцюгів жирних кислот Біо-ПАР синтезований *Burkholderia thailandensis* має нижчий ККМ порівняно з *P. aeruginosa* [10].

Піноутворювальні та емульгувальні властивості, Біо-ПАР можна використовувати в різних продуктах, таких як засоби для миття, зволожувачі, зубна паста та засоби особистої гігієни. Біосурфактанти, що синтезуються морськими мікроорганізмами, мають високу протимікробну, антиадгезивну та антибіоплівкову активності проти патогенних мікроорганізмів. Ці властивості Біо-ПАР можуть бути використані у косметичних засобах та засобах для догляду за шкірою. Крім того, деякі Біо-ПАР мають антиоксидантну активність і можуть блокувати вільні радикали. Тому Біо-ПАР можна застосовувати як антиоксиданти в продуктах по догляду за шкірою [38].

Для використання Біо-ПАР в харчових та косметичних продуктах необхідно знати токсичність цих сполук. Токсичність можна визначати на різних клітинних моделях та на тваринах. Гліколіпід BS-SLSZ2, що синтезується морською бактерією *Staphylococcus lentus*, ефективно пригнічував утворення біоплівки вібріонами та *P. aeruginosa* на поверхні еукаріотів аквакультур. Експерименти *in vivo* показали, що BS-SLSZ2 є нетоксичним по відношенню до артемії та ефективним у захисті *A. salina* від інфекцій *V. harveyi* та *P. aeruginosa* [14]. Штами морської *Pseudomonas sp.* MK90e8 та MK91CC8 синтезують массетолід А, новий циклічний депсипептид та віскозин. Массетолід А і віскозин проявляють *in vitro* антимікробну активність проти *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium avium*. Массетолід А є нетоксичним для мишей у дозі  $10 \text{ мг/кг}$  [11].

Ліпепептид псевдофактин ІІ, виділений з арктичного штаму *P. fluorescens* BD5, викликає апоптоз клітин меланоми, але практично не впливає на фібробласти шкіри. Механізм загибелі клітин меланоми може бути зумовлений підвищеною проникністю плазматичних мембран міцелами Біо-ПАР [16].

Біо-ПАР, що синтезуються морською бактерією *Nocardiosis* VITSISB, використовується у складі зубної пасти. Ця сполука є менш токсичною, чим лаурилсульфат натрію [7].

### Використання Біо-ПАР з морських організмів у промислових технологіях

Біо-ПАР використовуються у деяких промислових технологіях. Наприклад, при охолодженні та біопереробці. Для системи охолодження використовується однорідна суміш води та дрібних частинок льоду. Було показано, що діацетильовані Біо-ПАР стабілізують дрібні частинки льоду і тим самим запобігають їх агломерації та утворенню більших кристалів [19]. Крім того, добавки Біо-ПАР покращують текучі властивості біодизелю і, отже, його ефективність при низькій температурі [21]. Біо-ПАР також



застосовуються для поліпшення деградації складної біомаси в так званих процесах біопереробки, щоб використовувати альтернативні промислові ресурси. Тут їх добавки можуть підвищити ефективність ферментативної деградації лігноцелюлози, ймовірно, шляхом поліпшення зв'язування субстрату з целюлазами [20]. Добавки сурфактину та сапоніну збільшують виробництво водню з твердих органічних відходів [33].

Таким чином, Біо-ПАР корисні для різноманітних галузей застосування. Речовини, синтезовані морськими мікроорганізмами, представляють інтерес, оскільки вони пристосовані для ефективної роботи в холодному та/або солоному середовищі, що відкриває нові сфери використання [26]. У біотехнологічному виробництві не морських Біо-ПАР активно використовуються не тільки природні штами, але і гетерологічні продуценти [17, 29]. Однак такі стратегії виробництва біосурфактантів морськими продуцентами, переважно бактеріями, досліджувалися лише зрідка. Відомі два дослідження щодо використання гетерологічних штамів для синтезу похідних гліколіпідів *A. borkumensis* [24] та трегалозоліпідів *Rhodococcus* [4].

Виробництво Біо-ПАР шляхом культивування морських бактерій може створити технічні проблеми для встановлення надійних та здійснених умов накопичення продукту синтезу [36]. Крім того, внутрішні регуляторні схеми можуть вимагати додавання жиру для індукції біосинтезу Біо-ПАР [4], що, в свою чергу, ускладнює подальше накопичення продукту синтезу. Тому використання рекомбінантних технологій може бути перспективним підходом до накопичення Біо-ПАР морських мікроорганізмів та їх впровадження у різні галузі. Для цього необхідно вивчати біохімію та генетику цих морських мікроорганізмів продуцентів Біо-ПАР. В подальшому використання сучасних технологій, таких як метагеноміка та біоінформатика, сприятиме як одержанню нових Біо-ПАР з морських мікроорганізмів так і розширенню сфер їх застосування у промисловості.

**B.M. Galkin, M.O. Finogenova, M.B. Galkin,  
A.S. Semenets, T.O. Filipova**

Odesa I.I. Mechnikov National University,  
st. Dvoryanska, 2, Odessa, 65082, Ukraine,  
tel.: +380482635761 e-mail: bgalkin@ukr.net

### **BIOSURFACTANTS OF MARINE MICROORGANISMS: III. APPLICATIONS IN INDUSTRIAL TECHNOLOGIES**

#### **Summary**

*Surface-active compounds (SAC) and emulsifiers, due to their ability to reduce interfacial tension, are widely used in various industries. Most of the SAC used today are produced from non-renewable petrochemical raw materials and are not safe for living beings and the environment. Biosurfactants (BS) are synthesized by microorganisms from renewable raw materials, in particular, from food indus-*



try waste, they are a promising alternative to chemical surfactants due to their biological transformation and environmental friendliness. The advantage of BS produced by marine microbiota is that they exhibit their activity over a wide range of temperatures, pH and salinity. It is shown that these biosurfactants, in addition to surface-active properties, often have other types of activity: antimicrobial, antibiofilm, antioxidant. It has been established that biosurfactants of marine microorganisms can be widely used in industries such as the production of hygiene products, pharmaceuticals, cosmetology, food industry, agriculture, bioremediation, and oil production.

*Key words:* Biosurfactant, marine microorganisms, industrial technologies

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ahuja K., Singh S. Biosurfactants market size by product // Glob. Market Insights. – 2020.
2. Al-Mallah M., Goutx M., Mille G., Bertrand J-C. Production of emulsifying agents during growth of a marine *Alteromonas* in sea water with eicosane as carbon source, a solid hydrocarbon // Oil and Chem. Poll. – 1990. – V. 6(4). – P. 289–305.
3. Amaral P.F.F., da Silva J.M., Lehocky M. et al. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica* // Process. Biochem. – 2006. – V. 26(41). – P. 1894–1898.
4. Bages S., White D.A., Winterburn J.B. et al. Production and separation of a trehalolipid biosurfactant // Biochem. Eng. J. – 2018. – V. 38(1). – P. 85–94.
5. Banat I.M., Franzetti A., Gandolfi I. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 87(2). – P. 427–444.
6. Bezza F.A., Chirwa E.M.N. Pyrene biodegradation enhancement potential of lipopeptide biosurfactant produced by *Paenibacillus dendritiformis* CN5 strain // J. Hazard. Mater. – 2017. – V. 321(5). – P. 218–227.
7. Das I., Roy S., Chandni S. et al. Biosurfactant from marine actinobacteria and its application in cosmetic formulation of toothpaste // Der Pharm. Lett. – 2013. – V. 5(5). – P. 1–6.
8. Desai J.D., Banat I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997. – V. 61(1). – P. 47–64.
9. Dhasayan A., Kiran G.S., Selvin J. Production and characterisation of glycolipid biosurfactant by *Halomonas* sp. MB-30 for potential application in enhanced oil recovery // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2014. – V. 174(7). – P. 2571–2584.
10. Dubeau D., Deziel E., Woods D.E., Lepine F. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids // BMC Microbiol. – 2009. – V. 9(2). – P. 263–274.
11. Gerard J., Lloyd R., Barsby T. et al. Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two *Pseudomonads* isolated from marine habitats // J. Nat. Prod. – 1997. – V. 60(3). – P. 223–229.
12. Gutierrez T., Mulloy B., Bavington C. et al. Partial purification and chemical characterization of a glycoprotein (putative hydrocolloid) emulsifier pro-





- duced by a marine bacterium *Antarctobacter* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 76(12). – P. 1017–1026.
13. Gutierrez T., Mulloy B., Black K., Green D.H. Glycoprotein emulsifiers from two marine *Halomonas* species: chemical and physical characterization // J. Appl. Microbiol. – 2007. – V. 103(10). – P. 1716–1727.
  14. Hamza F., Satpute S., Banpurkar A. Biosurfactant from a marine bacterium disrupts biofilms of pathogenic bacteria in a tropical aquaculture system // FEMS Microbiol. Ecol. – 2017. – V. 93(11). – P. 1–11.
  15. Iyer A., Mody K., Jha B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide // Enzyme Microb. Technol. – 2006. – V. 38(1-2). – P. 220–222.
  16. Janek T., Krasowska A., Radwanska A., Lukaszewicz M. Lipopeptide biosurfactant pseudofactin II induced apoptosis of melanoma A 375 cells by specific interaction with the plasma membrane // PLoS One. – 2013. – V. 8(3). – e57991.
  17. Kiran G.S., Ninawe A.S., Lipton, A.N. et al. Rhamnolipid biosurfactants: Evolutionary implications, applications and future prospects from untapped marine resource // Crit. Rev. Biotechnol. – 2016. – V. 36(3). – P. 399–415.
  18. Kiran G.S., Priyadharsini S., Sajayan A. et al. Production of lipopeptide biosurfactant by a Marine *Nesterenkonia* sp. and its application in food industry // Front. Microbiol. – 2017. – 8:1381.
  19. Kitamoto D., Yanagishita H., Endo A. et al. Remarkable antiagglomeration effect of a yeast biosurfactant, diacylmannosylerythritol, on ice-water slurry for cold thermal storage // Biotechnol. Prog. – 2001. – V. 17(2). – P. 362–365.
  20. Liu J., Zhu N., Yang, J. et al. Lipopeptide produced from *Bacillus* sp. W112 improves the hydrolysis of lignocellulose by specifically reducing non-productive binding of cellulases with and without CBMs // Biotechnol. Biofuels. – 2017. – 10:301.
  21. Madihalli C., Sudhakar H., Doble M. Mannosylerythritol lipid-A as a pour point depressant for enhancing the low-temperature fluidity of biodiesel and hydrocarbon fuels // Energy Fuels. – 2016. – V. 30(5). – P. 4118–4125.
  22. Maneerat S., Bamba T., Harada K. et al. A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – V. 70(2). – P. 254–259.
  23. Nikolova Ch., Gutierrez T. Biosurfactants and their applications in the oil and gas industry: Current state of knowledge and future perspectives // Front. in Bioeng. and Biotech. – 2021. – 9:626639.
  24. Passeri A., Schmidt M., Haffner T. et al. Marine biosurfactants. IV. Production, characterization and biosynthesis of an anionic glucose lipid from the marine bacterial strain MM1 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1992. – V. 37(3). – P. 281–286.
  25. Pepi M., Cesaro A., Liut G., Baldi F. An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid // FEMS Microbiol. Ecol. – 2005. – V. 53(1). – P. 157–166.
  26. Perfumo A., Banat I.M., Marchant R. Going green and cold: Biosurfactants



- from low-temperature environments to biotechnology applications // Trends Biotechnol. – 2018. – V. 36(3). – P. 277–289.
27. Raddadi N., Giacomucci L., Totaro G., Fava F. *Marinobacter* sp. from marine sediments produce highly stable surface-active agents for combatting marine oil spills // Microb. Cell Fact. – 2017. – 16:186.
  28. Randhawa K.K.S., Rahman, P.K.S.M. Rhamnolipid biosurfactants past, present, and future scenario of global market // Front. Microbiol. – 2014. – 5:454.
  29. Roelants S.L.K.W., Ciesielska K., De Maeseneire S.L. et al. Towards the industrialization of new biosurfactants: Biotechnological opportunities for the lactone esterase gene from *Starmarella bombicola* // Biotechnol. Bioeng. – 2016. – V. 113(3). – P. 550–559.
  30. Rosenberg E., Zuckerberg A., Rubinovitz C., Gutnick D.L. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – V. 37(3). – P. 402–408.
  31. Santos D.K.F., Resende A.H.M., De Almeida D.G. et al. *Candida lipolytica* UCP0988 Biosurfactant: potential as a bioremediation agent and formulating a commercial related product // Front. Microbiol. – 2017. – 8:767.
  32. Shah A., Shahzad S., Munir A. et al. Micelles as soil and water decontamination agents // Chem Rev. – 2016. – V. 116(10). – P. 6042–6074.
  33. Sharma P., Melkania U. Biosurfactant-enhanced hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste using co-culture of *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes* // Bioresour. Technol. – 2017. – V. 243. – P. 566–572.
  34. Singh P., Patil Y., Rale V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies // J. Appl. Microbiol. – 2018. – V. 126(1). – P. 2–13.
  35. Souza, E.C., Vessoni-Penna T.C., de Souza Oliveira R.P. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview // Int. Biodeterior. Biodegradation. – 2014. – V. 89(1). – P. 88–94.
  36. Tripathi L., Irorere V.U., Marchant R., Banat I.M. Marine derived biosurfactants: A vast potential future resource // Biotechnol. Lett. – 2018. – V. 40(10). – P. 1441–1457.
  37. Vecino X., Cruz J.M., Moldes A.B., Rodrigues L.R. Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges // Crit. Rev. Biotechnol. – 2017. – V. 37(10). – P. 911–923.
  38. Vecino X., Rodríguez-López L., Cruz J.M. et al. Sewage sludge polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) decontamination technique based on the utilization of a lipopeptide biosurfactant extracted from corn steep liquor // J. Agric. Food Chem. – 2015. – V. 63(32). – P. 7143–7150.
  39. White D.A., Hird L.C., Ali S.T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp. strain PML026 // J. Appl. Microbiol. – 2013. – V. 115(3). – P. 744–755.
  40. Zenati B., Chebbi A., Badis A. et al. A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2018. – V. 154(5). – P. 100–107.



## REFERENCES

1. Ahuja K, Singh S. Biosurfactants market size by product. Glob Market Insights. 2020; 564.
2. Al-Mallah M, Goutx M, Mille G, Bertrand J-C. Production of emulsifying agents during growth of a marine *Alteromonas* in sea water with eicosane as carbon source, a solid hydrocarbon. Oil and Chem Poll. 1990;6(4):289–305.
3. Amaral PFF, da Silva JM, Lehocky M et al. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. Process Biochem. 2006;26(41): 1894–1898.
4. Bages S, White DA, Winterburn JB et al. Production and separation of a trehalolipid biosurfactant. Biochem Eng J. 2018;38(1):85–94.
5. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;87(2):427–444.
6. Bezza FA, Chirwa EMN. Pyrene biodegradation enhancement potential of lipopeptide biosurfactant produced by *Paenibacillus dendritiformis* CN5 strain. J Hazard Mater. 2017;321(5):218–227.
7. Das I, Roy S, Chandni S et al. Biosurfactant from marine actinobacteria and its application in cosmetic formulation of toothpaste. Der Pharm Lett. 2013;5(5): 1–6.
8. Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol Mol Biol Rev. 1997;61(1):47–64.
9. Dhasayan A, Kiran GS, Selvin J. Production and characterisation of glycolipid biosurfactant by *Halomonas* sp. MB-30 for potential application in enhanced oil recovery. Appl Biochem Biotechnol. 2014;174(7):2571–2584.
10. Dubeau D, Deziel E, Woods DE, Lepine F. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. BMC Microbiol. 2009;9(2):263–274.
11. Gerard J, Lloyd R, Barsby T et al. Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two *Pseudomonads* isolated from marine habitats. J. Nat Prod. 1997;60(3):223–229.
12. Gutierrez T, Mulloy B, Bavington C et al. Partial purification and chemical characterization of a glycoprotein (putative hydrocolloid) emulsifier produced by a marine bacterium *Antarctobacter*. Appl Microbiol Biotechnol. 2007;76(12):1017–1026.
13. Gutierrez T, Mulloy B, Black K, Green D.H. Glycoprotein emulsifiers from two marine *Halomonas* species: chemical and physical characterization. J Appl Microbiol. 2007;103(10):1716–1727.
14. Hamza F, Satpute S, Banpurkar A. Biosurfactant from a marine bacterium disrupts biofilms of pathogenic bacteria in a tropical aquaculture system. FEMS Microbiol Ecol. 2017;93(11):1–11.
15. Iyer A, Mody K, Jha B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. Enzyme Microb Technol. 2006;38(1-2):220–222.
16. Janek T, Krasowska A, Radwanska A, Lukaszewicz M. Lipopeptide biosurfactant pseudofactin II induced apoptosis of melanoma A 375 cells by specific interaction with the plasma membrane. PLoS One. 2013;8(3): e57991.





17. Kiran GS, Ninawe AS, Lipton AN et al. Rhamnolipid biosurfactants: Evolutionary implications, applications and future prospects from untapped marine resource. *Crit Rev Biotechnol.* 2016;36(3):399–415.
18. Kiran GS, Priyadharsini S, Sajayan A et al. Production of lipopeptide biosurfactant by a Marine *Nesterenkonia* sp. and its application in food industry. *Front Microbiol.* 2017;8(1):1–15.
19. Kitamoto D, Yanagishita H, Endo A et al. Remarkable antiagglomeration effect of a yeast biosurfactant, diacylmannosylerythritol, on ice-water slurry for cold thermal storage. *Biotechnol Prog.* 2001;17(2):362–365.
20. Liu J, Zhu N, Yang J et al. Lipopeptide produced from *Bacillus* sp. W112 improves the hydrolysis of lignocellulose by specifically reducing non-productive binding of cellulases with and without CBMs. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10(1):1–12.
21. Madihalli C, Sudhakar H, Doble M. Mannosylerythritol lipid-A as a pour point depressant for enhancing the low-temperature fluidity of biodiesel and hydrocarbon fuels. *Energy Fuels.* 2016;30(5):4118–4125.
22. Maneerat S, Bamba T, Harada K et al. A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;70(2):254–259.
23. Nikolova Ch, Gutierrez T. Biosurfactants and their applications in the oil and gas industry: current state of knowledge and future perspectives. *Front in Bioeng and Biotech.* 2021;9(626639):1–19.
24. Passeri A, Schmidt M, Haffner T et al. Marine biosurfactants. IV. Production, characterization and biosynthesis of an anionic glucose lipid from the marine bacterial strain MM1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992;37(3):281–286.
25. Pepi M, Cesaro A, Liut G, Baldi F. An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005;53(1):157–166.
26. Perfumo A, Banat IM, Marchant R. Going green and cold: Biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. *Trends Biotechnol.* 2018;36(3):277–289.
27. Raddadi N, Giacomucci L, Totaro G, Fava F. *Marinobacter* sp. From marine sediments produce highly stable surface-active agents for combatting marine oil spills. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):1–13.
28. Randhawa KKS, Rahman PKS.M. Rhamnolipid biosurfactants past, present, and future scenario of global market. *Front Microbiol.* 2014;5(454):1–8.
29. Roelants SLKW, Ciesielska K, De Maeseneire SL et al. Towards the industrialization of new biosurfactants: Biotechnological opportunities for the lactone esterase gene from *Starmarella bombicola*. *Biotechnol Bioeng.* 2016; 113(3):550–559.
30. Rosenberg E, Zuckerberg A, Rubinovitz C, Gutnick DL. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl Environ Microbiol.* 1979;37(3):402–408.
31. Santos DKF, Resende AHM., De Almeida DG et al. *Candida lipolytica*



- UCP0988 Biosurfactant: potential as a bioremediation agent and formulating a commercial related product. *Front Microbiol.* 2017;8(10):767.
32. Shah A, Shahzad S, Munir A et al. Micelles as soil and water decontamination agents. *Chem Rev.* 2016;116(10):6042–6074.
  33. Sharma P, Melkania U. Biosurfactant-enhanced hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste using co-culture of *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes*. *Bioresour Technol.* 2017;243:566–572.
  34. Singh P, Patil Y, Rale V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *J Appl Microbiol.* 2018;126(1):2–13.
  35. Souza, EC, Vessoni-Penna TC, de Souza Oliveira RP. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2014;89(1):88–94.
  36. Tripathi L, Irorere VU, Marchant R, Banat IM. Marine derived biosurfactants: A vast potential future resource. *Biotechnol Lett.* 2018;40(10):1441–1457.
  37. Vecino X, Cruz JM, Moldes AB, Rodrigues LR. Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. *Crit Rev Biotechnol.* 2017;37(10):911–923.
  38. Vecino X, Rodríguez-López L, Cruz J M et al. Sewage sludge polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) decontamination technique based on the utilization of a lipopeptide biosurfactant extracted from corn steep liquor. *J Agric Food Chem.* 2015;63(32):7143–7150.
  39. White DA, Hird LC, Ali ST. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp. strain PML026. *J Appl Microbiol.* 2013;115(3):744–755.
  40. Zenati B, Chebbi A, Badis A et al. A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018;154(5):100–107.

Стаття надійшла до редакції 08.08.2022 р.



**І.В. Страшнова, К.С. Потапенко, Н.Ю. Васильєва,  
Н.В. Коротаєва, І.П. Метеліцина**

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

**ЧУТЛИВІСТЬ ДО ВАЖКИХ МЕТАЛІВ  
АКТИНОБАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ БІОЛОГІЧНИХ  
ОБРОСТАНЬ ЧЕРЕПАШНИКУ І МІДІЙ ОДЕСЬКОЇ  
ЗАТОКИ ЧОРНОГО МОРЯ**

*Забруднення навколишнього середовища важкими металами є однією із найбільш важливих екологічних проблем, що зумовлює розробку стратегій біоремедіації і пошук біомаркерів для оцінки його стану. **Мета.** Визначити чутливість до важких металів актинобактерій, виділених із біологічних обростань природного черепашику і мідій Одеської затоки Чорного моря. **Методи.** Використано 34 штами актинобактерій, ізольованих із обростань черепашику і мідій Одеської затоки. Чутливість досліджуваних бактерій до катіонів важких металів визначали на крохмаль-казеїновому агарі диско-дифузійним методом. Використано диски, просочені розчинами солей  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  у концентраціях катіонів 0,001 моль/л, 0,01 моль/л, 0,05 моль/л, 0,1 моль/л, 0,5 моль/л і 1,0 моль/л. **Результати.** Досліджені актинобактерії проявили варіабельну чутливість до важких металів, яка залежала від джерела виділення, штаму, типу металу і його концентрації. Усі досліджені бактерії були найбільш чутливими до  $Cd^{2+}$  з мінімальною інгібуючою концентрацією (МІК) 0,001 моль/л, найбільш стійкими до  $Zn^{2+}$  (для більшості бактерій МІК була вищою 1,0 моль/л). У концентраціях, менших за МІК, цинк стимулював утворення повітряного міцелію бактерій майже всіх штамів, у деяких з них збільшувалося пігментоутворення. Чутливість до важких металів актинобактерій, виділених із черепашику, знижувалася у такій послідовності:  $Cd^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+}$ , а у актинобактерій, ізольованих із мідій, –  $Cd^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+}$ . **Висновки.** Актинобактерії, ізольовані з мідій, є більш чутливими до кадмію, купруму, кобальту, нікелю і цинку ніж актинобактерії з черепашику. Усі досліджені штами виявилися високочутливими до  $Cd^{2+}$  (МІК  $Cd^{2+}$  майже для усіх штамів складала 0,001 моль/л) і стійкі до  $Zn^{2+}$  у діапазоні концентрацій 0,001 моль/л – 0,5 моль/л.*

*Ключові слова:* морські актинобактерії, чутливість, важкі метали

Забруднення довкілля важкими металами є однією із найбільш важливих екологічних проблем з огляду на стійку, латентну та кумулятивну природу таких токсичних забруднювачів, які не піддаються біологічному розкладанню. Метали потрапляють у навколишнє середовище, у тому числі морську

© І.В. Страшнова, К.С. Потапенко, Н.Ю. Васильєва, Н.В. Коротаєва, І.П. Метеліцина, 2022



екосистему, шляхом природних геохімічних процесів і в результаті антропогенного забруднення [13, 19].

Деякі метали, такі як Cu, Co, Fe, Mn, Se, Zn, Ni, є важливими мікроелементами для мікробіоти, необхідними для підтримки деяких біологічних функцій, вони діють як кофактори, що мають важливі структурні та каталітичні властивості в ферментах та білках, переносників електронів та регуляторів клітинного осмотичного тиску.

Як нестача, так і збільшення концентрації цих металів у середовищі призводить, у першу чергу, до порушення функціональної діяльності бактеріальної клітини [6]. Такі важкі метали як Al, Pb, Cd, Hg не відіграють якоїсь біологічної ролі та є токсичними для живих організмів [14].

Природа інгібуючого впливу важких металів на бактерії складна, тому розглядати цей процес необхідно з урахуванням широкого комплексу фізико-хімічних факторів зовнішнього середовища, а також індивідуальних особливостей кожного виду і штаму бактерій. Токсичність важких металів значною мірою залежить від форми металу, рН, наявності органічних речовин, температури навколишнього середовища [4]. Токсична дія важких металів має неспецифічний характер, впливає на ріст, морфологічні, фізіолого-біохімічні, генетичні параметри, енергетичні та біосинтетичні процеси мікроорганізмів [12, 13, 15]. Намагаючись забезпечити захист чутливих компонентів, клітина може розробити систему металорезистентності. Ступінь стійкості мікроорганізму визначають кілька факторів: тип та кількість механізмів поглинання металів, роль, яку кожен метал відіграє у нормальному метаболізмі, та наявність генів, локалізованих у хромосомах, плазмідах, транспозонах, які контролюють резистентність до металів [19].

Способи вилучення важких металів із навколишнього середовища можна поділити на дві групи: біотичні методи, основою яких є накопичення важких металів живими організмами, перш за все, мікроорганізмами та абіотичні методи, в основі яких лежать такі фізико-хімічні процеси, як осадження, адсорбція і т.п. [9, 11]. Проте фізико-хімічні процеси є дорогими і не забезпечують остаточного вирішення проблеми, пов'язаної із забрудненням довкілля важкими металами. Стратегії біоремедіації – екологічні, економічно доцільні, ефективні та селективні до забруднювачів, передбачають використання стійких до металів мікроорганізмів, які здатні рости і активно функціонувати при їх високих концентраціях. Відомо кілька механізмів стійкості бактерій до важких металів, серед яких виділяють: наявність або формування позаклітинного бар'єру, активний транспорт йонів металів із клітини, позаклітинне або внутрішньоклітинне зв'язування та відновлення йонів металів до нерозчинних сполук [12].

Серед бактерій, які часто використовуються для стратегії біоремедіації увагу привертають члени філуму *Actinobacteria*. Ця група включає бактерії з дуже різноманітними фізіологічними та метаболічними властивостями, здатністю колонізувати різноманітні субстрати, що є відображенням геномної неоднорідності [12]. Найчастіше у процесах біоремедіації неорганічних і органічних сполук використовують представників роду *Streptomyces* та групи CMNR (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* і *Rhodococcus*) [11, 19]. Перспективним також є використання актинобактерій як чутливих біомарке-



рів для оцінки стану навколишнього середовища, включаючи забруднення окремими важкими металами. Для розширення можливостей актинобактерій у біоремедіації були розроблені такі стратегії, як біоаугментація, іммобілізація клітин, виробництво біосурфактантів, біостимуляція росту і розвитку рослин у системі рослина-актинобактерія та ін. [9].

З огляду на викладене вище, метою роботи було визначити чутливість до важких металів актинобактерій, виділених із біологічних обростань природного черепашику і мідій Одеської затоки Чорного моря.

### Матеріали і методи

Дослідження проводили зі штамми актинобактерій, 20 із яких виділені із біологічних обростань природного черепашику, 14 штамів – із мідій (*Mytilus galloprovincialis*). Зразки черепашику були зібрані на глибині 0,2–1,0 м, мідій – 3,0–5,0 метрів у червні–липні 2020 р. в Одеській затоці Чорного моря в районі Гідробіологічної станції Одеського національного університету імені І.І. Мечникова (Одеса, Україна, 46°27'01''N 30°46'14''E). За результатами порівняння жирнокислотних спектрів з використанням бібліотеки MIDI Sherlock (ACTIN 3.80) 19 штамів, ізольованих з біологічних обростань черепашику, та всі штами із мідій були ідентифіковані з різними індексами подібності як представники роду *Streptomyces*, один штам із черепашику відноситься до роду *Nocardioopsis* [5, 7].

Чутливість актинобактерій до катіонів важких металів визначали на середовищі крохмаль-казеїновий агар [22] диско-дифузійним методом. Актинобактеріями щільно засівали поверхню середовища, після чого на нього розкладали стерильні диски фільтрувального паперу, просочені розчинами солей  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{Co}^{2+}$  ( $\text{CoSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{Ni}^{2+}$  ( $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{CdSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) і  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) у концентраціях катіонів 0,001 моль/л, 0,01 моль/л, 0,05 моль/л, 0,1 моль/л, 0,5 моль/л і 1,0 моль/л.

Контролем були чашки з крохмаль-казеїновим агаром без додавання розчинів солей металів, засіяні актинобактеріями відповідних штамів.

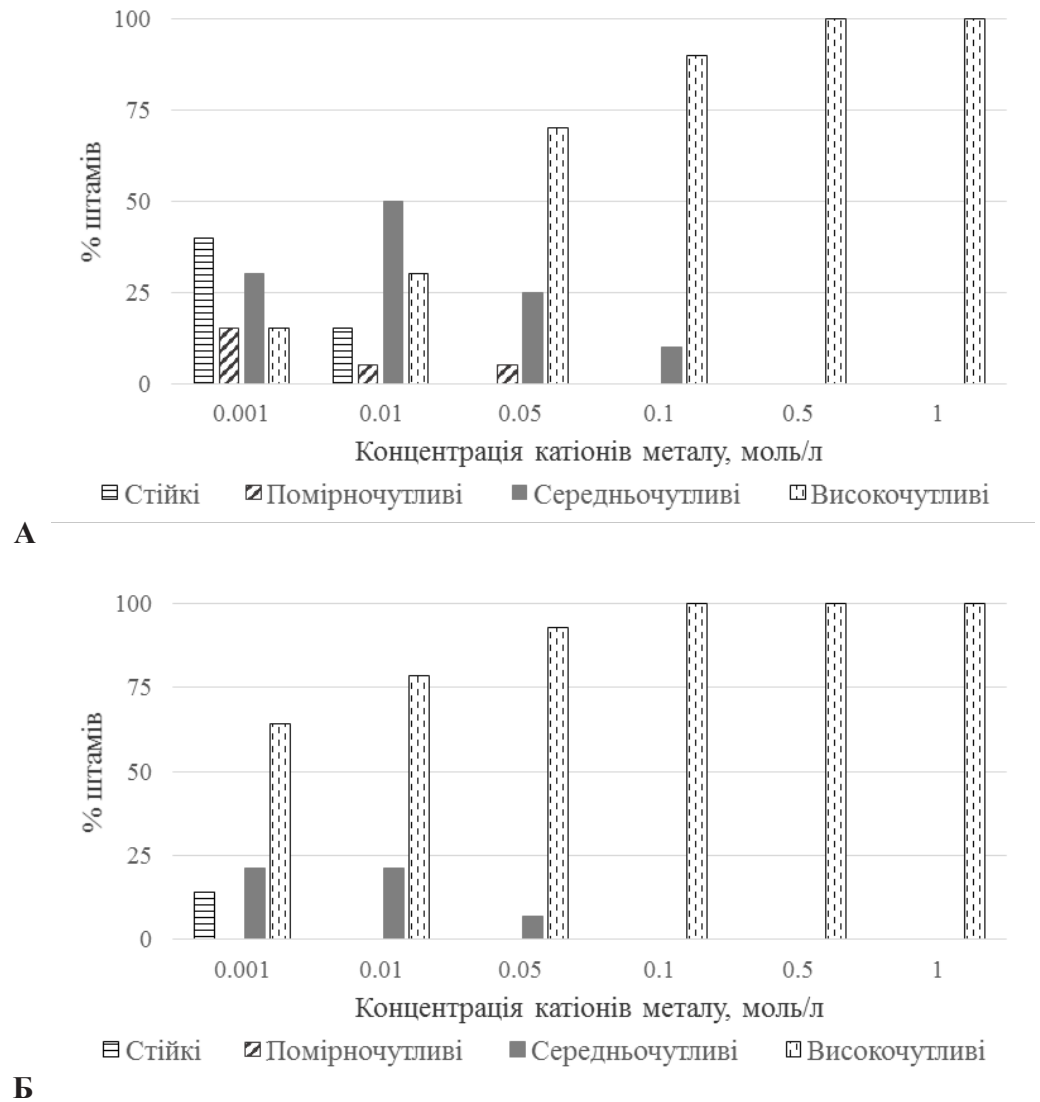
Посіви культивували при 28 °С. Облік результатів проводили через 5 (проміжні) і 10 (остаточні) діб, вимірюючи розміри зон відсутності росту штамів навколо дисків. За наявності зони відсутності росту  $\leq 10$  мм штам вважали помірночутливим, від 11 мм до 20 мм – середньочутливим,  $\geq 21$  мм – високочутливим; при наявності росту навколо диску з металом штам вважали стійким. Мінімальною інгібуючою (пригнічувальною) вважали концентрацію (МК), при якій спостерігали відсутність росту штаму.

Дослідження проведено в трьох повторях. Для аналізу отриманих результатів проведено описову статистику, яку здійснювали за допомогою програми Microsoft Office Excel-2016.

### Результати та їх обговорення

Дослідження чутливості актинобактерій, виділених із біологічних обростань черепашику і мідій, до важких металів виявило, що майже усі штами високочутливі до катіонів купруму у концентраціях 1,0 моль/л – 0,1 моль/л  $\text{Cu}^{2+}$  (рис. 1 А, Б). У діапазоні концентрацій  $\text{Cu}^{2+}$  від 0,01 моль/л до 0,001 моль/л виявлено штами з різним рівнем чутливості. Стрептоміцети штамів із мідій





**Рис. 1. Чутливість штамів актинобактерій до різних концентрацій  $\text{Cu}^{2+}$  (через 10 діб)**  
Примітка: А – виділені з черепашнику; Б – виділені з мідій

**Fig. 1. Sensitivity of actinobacteria strains to different concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  (after 10 days)**

Note: A – isolated from shell rock; B – isolated from mussels

є чутливішими до купруму у порівнянні із бактеріями, виділеними із черепашнику. Найменш токсичним для усіх виділених штамів актинобактерій був купрум у концентрації у 0,001 моль/л. За такої концентрації виявлено стійкі штами (40,0% із черепашнику і 14,3% із мідій).

Відомо, що купрум є важливим мікроелементом. Він входить до складу ферментів галактозооксидази, глутамілтрансферази, гіпонітритредуктази, редуктази окису азоту.





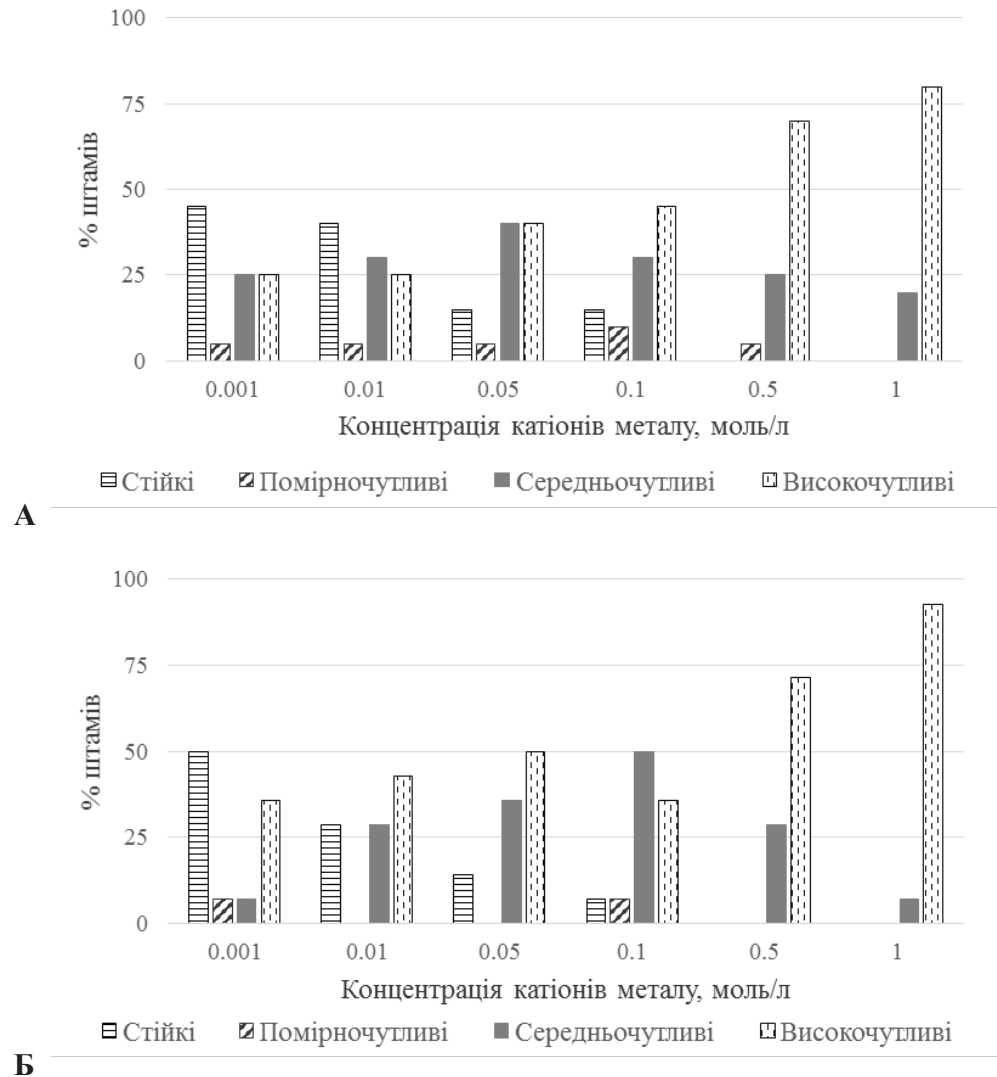
Купрум бере участь в окисно-відновних реакціях, диханні, метаболізмі вуглеводів та білків, азотному обміні, впливає на мембранні  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-ази, на структуру та функції нуклеїнових кислот, синтез фосфоліпідів. В разі нестачі цього елемента пригнічується обмін речовин, у першу чергу, в результаті порушення активності купрумвмісних ферментів. Надмірна концентрація купруму спричиняє токсичний вплив на живі організми [6].

У дослідженнях інших авторів показано, що реакція мікроорганізмів різних таксономічних груп на купрум (як і на багато інших важких металів) визначається багатьма параметрами і залежить, зокрема, від виду мікроорганізму (а часто навіть штаму), джерела виділення, концентрації металу, умов проведення експерименту та ін. [2, 3, 8]. Так, у дослідженнях Н.Ю. Васильєвої та ін. [3] встановлено, що більшість штамів чорноморських лактобацил (57,1%) росли при концентрації  $\text{Cu}^{2+}$  0,5 мМ, 14,2% – при концентрації 1 мМ і 23,8% – при 5 мМ. При дослідженні ацидофільних хемолітотрофних бактерій, виділених із техногенної сировини, стійкість до купруму коливалася у межах 2,5 – 11,5 г/дм<sup>3</sup> у залежності від штаму [1]. Нейтрофільні гіононі бактерії, ізольовані з води Чорного моря, були здатні до акумуляції  $\text{Cu}(\text{II})$  з водного розчину в межах від 22,83% до 89,24% і при цьому активність залежала від штаму та не залежала від МІК [2]. Штами *Streptomyces* spp. АВ2А, АВ3 і АВ5А, виділені із забруднених купрумом відкладень дренажного каналу, інтенсивно росли на мінімальному середовищі із 0,5 мМ вмістом сульфату купруму, при цьому демонструючи морфологічну, фізіологічну і молекулярну неоднорідність [8]. При формуванні стійкості до купруму у актинобактерій відзначають механізми біоаккумуляції, біосорбції та біотрансформації [19].

Окрім купруму, важливими мікроелементами для багатьох мікроорганізмів є нікель і кобальт. Кобальт є невід'ємним компонентом комплексу вітамінів  $\text{B}_{12}$  [13, 18], нікель – необхідним кофактором деяких ключових ферментів, у першу чергу, супероксиддисмутази, гідрогенази й уреази [23].

Виділені стрептоміцети виявилися стійкішими до дії кобальту і нікелю, у порівнянні із купрумом. При цьому рівні чутливості залежали від металу, його концентрації і штаму актинобактерій. Із збільшенням концентрації  $\text{Co}^{2+}$  і  $\text{Ni}^{2+}$  від 0,001 моль/л до 1,0 моль/л частка стійких штамів закономірно зменшувалася, натомість зростала частка середньо- та високочутливих штамів (рис. 2 А, Б; 3 А, Б).

До кобальту і нікелю у найменшій концентрації (0,001 моль/л) частка стійких актинобактерій із черепашнику складала, відповідно, 45,0% і 60,0%, із мідій – 50,0% і 42,9%. За дії  $\text{Co}^{2+}$  у концентраціях 0,5 моль/л і 1,0 моль/л ріст переважної більшості усіх досліджених бактерій не спостерігався, тобто вони були високочутливими. Щодо нікелю в цих же концентраціях, то більшість штамів також не росла, але при цьому актинобактерії із мідій були більш чутливими, ніж актинобактерії із черепашнику. Пороговою концентрацією катіонів кобальту, до якої виявлено резистентні штами як із черепашнику, так із мідій, є 0,1 моль/л. Цей же показник катіонів нікелю для штамів із черепашнику становив 0,1 моль/л, для штамів із мідій – 0,05 моль/л. Отримані результати підтверджуються публікаціями інших дослідників, мова в яких йде про залежність рівня стійкості мікроорганізмів до кобальту і нікелю від природного й



**Рис. 2. Чутливість штамів актинобактерій до різних концентрацій  $\text{Co}^{2+}$  (через 10 діб)**  
Примітка: А – виділених із черепашнику; Б – виділених із мідій

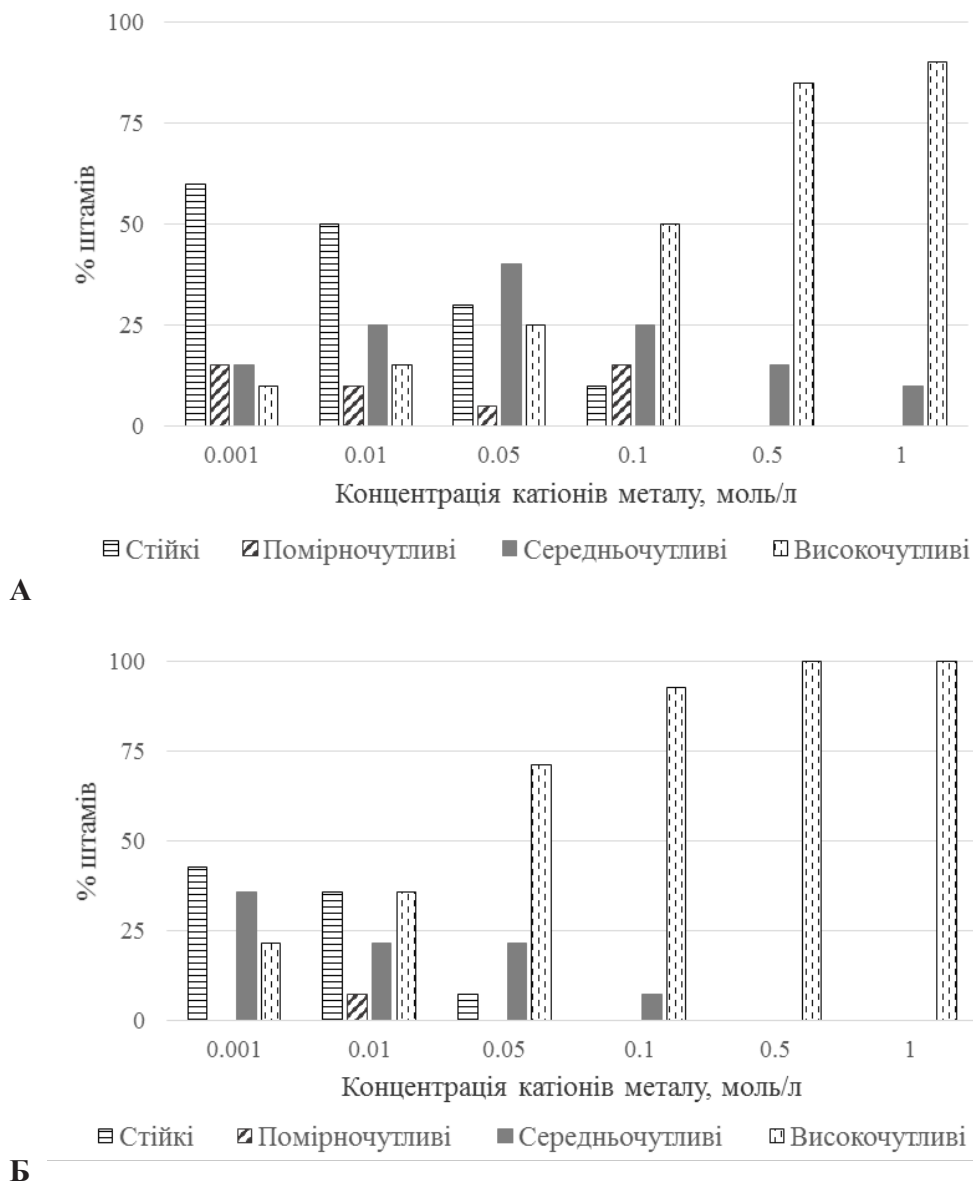
**Fig. 2. Sensitivity of actinobacteria strains to different concentrations of  $\text{Co}^{2+}$  (after 10 days)**

Note: A – isolated from shell rock; B – isolated from mussels

антропогенного навантаження на джерело виділення і безпосередньо штаму мікроорганізму [17, 20]. Так, у дослідженнях Matej Remenár et al. [20] відзначається, що виділені із ґрунту актинобактерії були стійкі до нікелю, кобальту, а також до інших важких металів, при цьому спостерігалася дивергенція всередині самої групи бактерій. Про мікробну толерантність до важких металів, як індивідуальну ознаку мікроорганізмів, вказано у публікації Edyta Boros-Lajszner et al. [17]. При цьому автори зазначають, що забруднення ґрунту  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  та  $\text{Ni}^{2+}$  суттєво вплинуло на мікробне різноманіття загалом і суттєво







**Рис. 3. Чутливість штамів актинобактерій до різних концентрацій Ni<sup>2+</sup> (через 10 діб)**  
Примітка: А – виділених із черепашнику; Б – виділених із мідій

**Fig. 3. Sensitivity of actinobacteria strains to different concentrations of Ni<sup>2+</sup> (after 10 days)**  
Note: A – isolated from shell rock; B – isolated from mussels

зменшило генетичне різноманіття бактерій, зокрема у представників філумів *Actinobacteria* та *Proteobacteria*. Мікроорганізми, резистентні до мінливих умов навколишнього середовища (наприклад, забруднення важкими металами), можуть порушувати гомеостаз екониші, це призводить до еволюції стійких бактерій, що, у свою чергу, знижує біорізноманіття в даному біотопі [17].

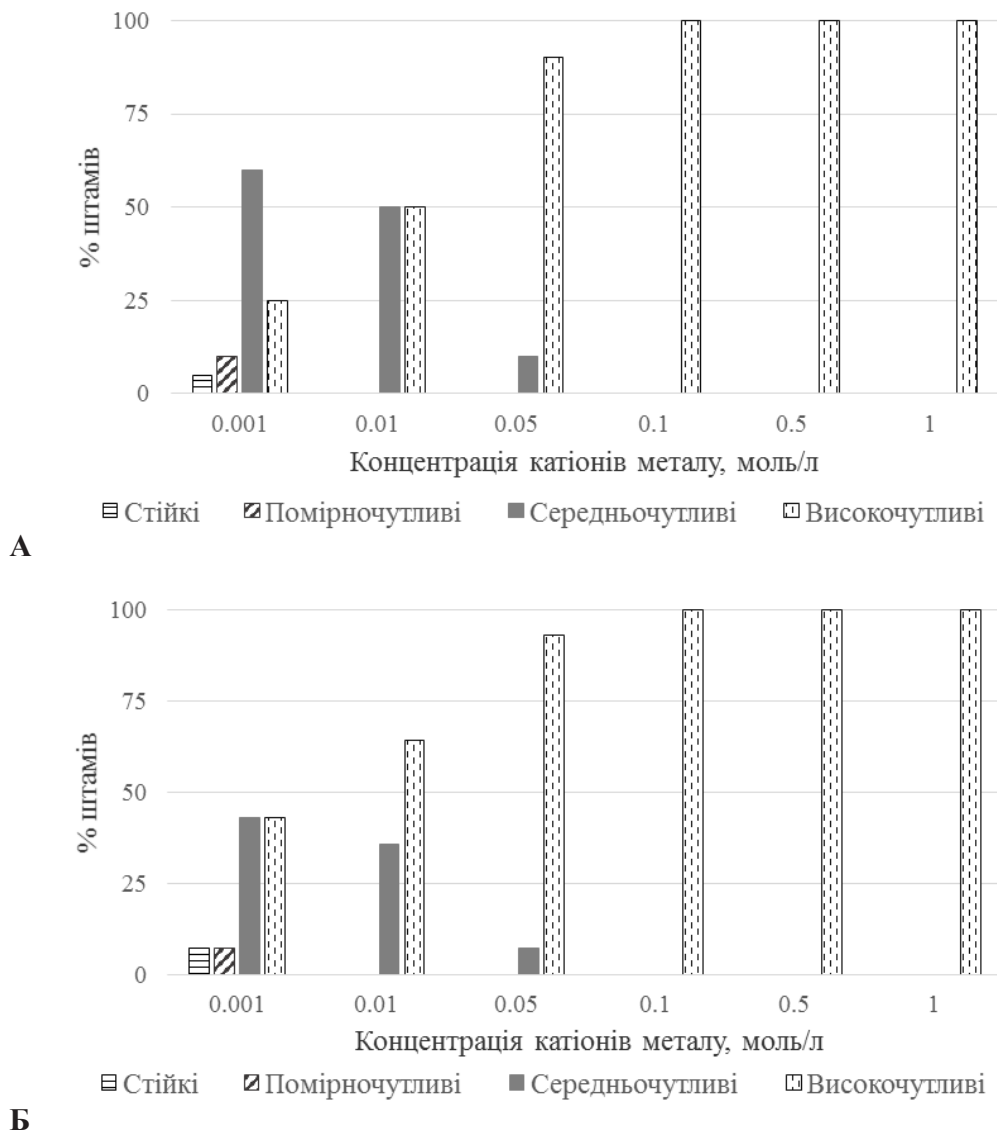
Щодо резистентності до  $\text{Co}^{2+}$  та  $\text{Ni}^{2+}$  відзначається формування у актинобактерій здатності до біоаккумуляції, біосорбції, еффлюксу [19]. Є дані про те, що мікроорганізми виживають у забруднених середовищах завдяки відновленню металів до нижчого ступеня окиснення (менш токсичних) або завдяки зв'язуванню металів за участі специфічних та неспецифічних сполук, які є продуктами метаболізму мікроорганізмів [18]. Специфічні сполуки включають металотіонеїни, а неспецифічні сполуки включають низькомолекулярні органічні кислоти, спирти та високомолекулярні поліцукриди [17]. Розподіл акумульованих важких металів залежить від виду мікроорганізму та самого металу. Йони купруму, цинку, нікелю, кобальту, мангануму частіше транспортуються у клітину. Гидраргірум, кадмій, аргентум, уран сорбуються в основному бактеріями та грибами на поверхні клітин, лише частково проникаючи усередину [17].

Одним із важких металів, який не має ніякої біологічної цінності і досить токсичний для мікроорганізмів навіть у дуже малих концентраціях, є кадмій. Кадмій, а також плумбум згубно впливають на мікроорганізми: пошкоджують клітинні мембрани і руйнують або змінюють структуру ДНК, внаслідок витіснення металів з їх нативних місць зв'язування або взаємодії лігандів, що викликає функціональні порушення [14]. Отримані результати показали високу чутливість актинобактерій, виділених із Одеської затоки, до кадмію. Досліджені штами втрачали життєздатність за дії  $\text{Cd}^{2+}$  у діапазоні концентрацій 0,001 моль/л – 0,01 моль/л (рис. 4 А, Б).

У публікаціях деяких інших дослідників також відмічається висока чутливість бактерій цієї групи до кадмію [12, 14]. Однак, є публікації, в яких наведено дані, що актинобактерії є стійкішими до  $\text{Cd}^{2+}$  у порівнянні з іншими групами мікроорганізмів [16, 22]. Зокрема, у роботі Chotinan Junpradit et al. [16] показано, що штами *Streptomyces rapamycinicus* K5PN1 і *Streptomyces suaneus* 11-10SHT, виділені із коріння рослин у торф'яно-болотних лісах, стійкі до кадмію і продукують у великих кількостях індол-3-оцтову кислоту і сидерофори, відповідно, що, можливо зумовлює стійкість.

Щодо цинку, то це важливий перехідний метал, який є незамінним у каталітичній і структурній функції білків, відіграє важливу окисно-відновлювальну та регуляторну роль. Бактерії включають його до складу 5 – 6% всіх своїх білків, які беруть участь, наприклад, у реплікації ДНК, регуляції рН та гліколізі. Цинк є другим за важливістю йоном металу в живих організмах після феруму [23]. Однак надлишок цинку є токсичним для мікроорганізмів, у тому числі актинобактерій, насамперед тому, що він є висококонкурентним двовалентним металом і витісняє слабкіше зв'язані перехідні метали в активних центрах металоферментів, якщо його не регулювати [19]. У дослідженнях Seung-Hwan Choi et al. [10] описано режим цинк-залежної активації генів, який використовує один металорегулятор для контролю генів як для поглинання, так і для експорту в широкому діапазоні концентрацій цинку. Незважаючи на тонку систему регуляції гомеостазу цинку у бактеріях, варто відзначити високу пристосованість деяких штамів стрептоміцетів до високого навантаження металом, як, наприклад, у випадку *Streptomyces* sp. K11, який був стійким і спроможним біоакмулювати значні концентрації йонів  $\text{Zn}^{2+}$  [19].





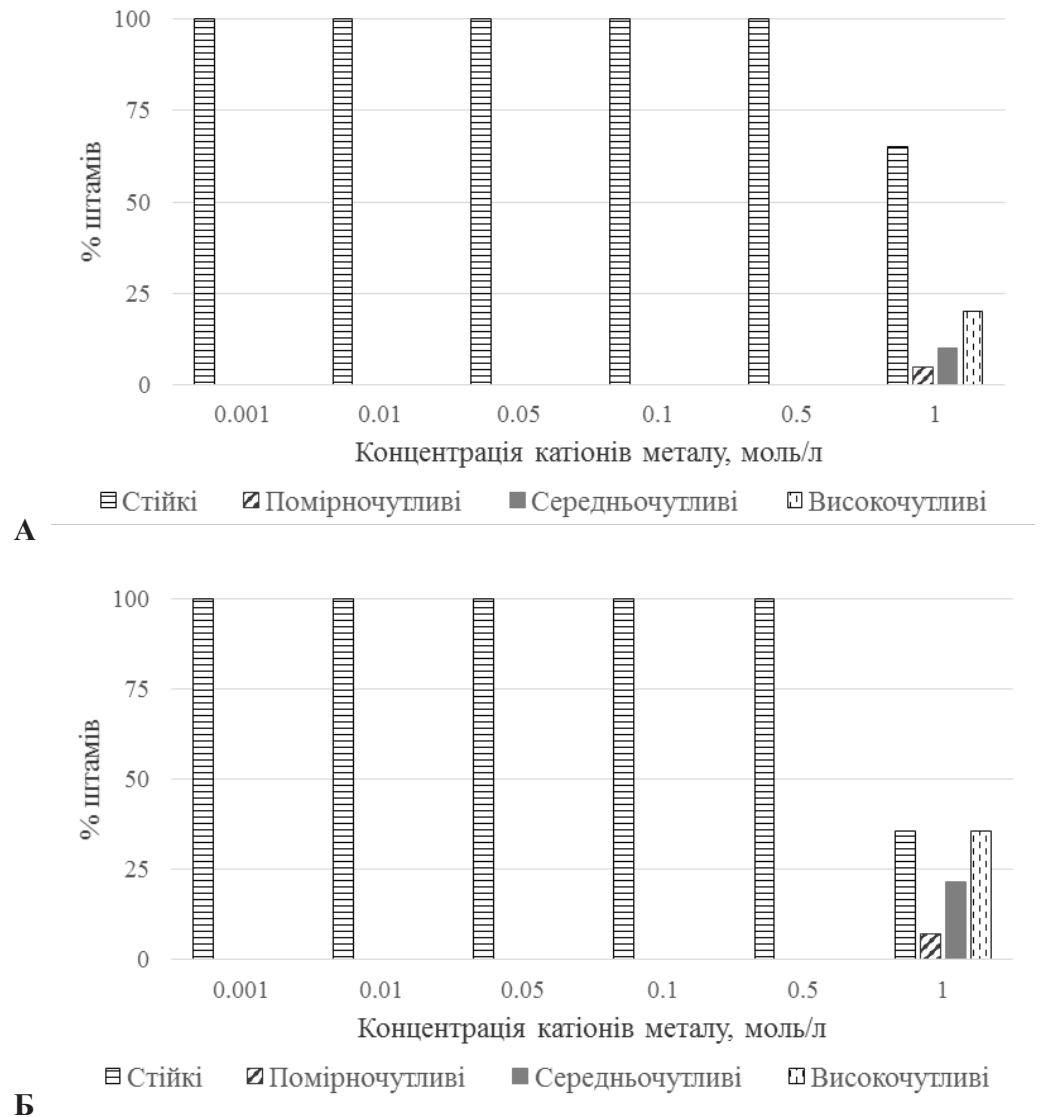
**Рис. 4. Чутливість штамів актинобактерій до різних концентрацій  $Cd^{2+}$  (через 10 діб)**  
Примітка: А – виділених із черепашнику; Б – виділених із мідій

**Fig. 4. Sensitivity of actinobacteria strains to different concentrations of  $Cd^{2+}$  (after 10 days)**

Note: A – isolated from shell rock; B – isolated from mussels

У проведених дослідженнях усі актинобактерії проявили стійкість до катіонів цинку у діапазоні концентрацій 0,001 моль/л – 0,5 моль/л, багато штамів, здебільшого із черепашнику, продемонстрували інтенсивне утворення повітряного міцелію.

Пороговою для досліджених актинобактерій була концентрація 1,0 моль/л катіонів цинку (рис. 5 А, Б).



**Рис. 5. Чутливість штамів актинобактерій до різних концентрацій  $Zn^{2+}$  (через 10 діб)**  
Примітка: А – виділених із черепашнику; Б – виділених із мідій

**Fig. 5. Sensitivity of actinobacteria strains to different concentrations of  $Zn^{2+}$  (after 10 days)**

Note: A – isolated from shell rock; B – isolated from mussels

До цинку у такій концентрації виявилися високочутливими 20,0% актинобактерій із черепашнику і 35,7% – із мідій. Однак більшість штамів (65,0%) із черепашнику інтенсивно росли і при такій концентрації цього металу.

Відзначимо, що у деяких штамів цинк також стимулював пігментоутворення. Так, інтенсивний синтез водорозчинних пігментів за дії  $Zn^{2+}$  в усіх концентраціях відмічено для актинобактерій *Streptomyces* sp. Lum 6.1 (виділено із обростань черепашнику) і *Streptomyces* spp. Myt 4, Myt 6, Myt 7ch,



Myt 8 і Myt 10 (штами із мідій). При цьому різноманітною була кольорова гама синтезованих пігментів. *Streptomyces* sp. Lym 6.1 і *Streptomyces* sp. Myt 7ch продукували темно-сірий пігмент, *Streptomyces* sp. Myt 4 – яскраво-зелений, а *Streptomyces* sp. Myt 6 – темно-зелений; інтенсивну лимонно-жовту пігментацію спостерігали при рості *Streptomyces* sp. Myt 10, коричнево-оранжеву – *Streptomyces* sp. Myt 8. Окрім згадуваних штамів, стимуляція утворення пігменту чорного кольору відзначена у штамів *Streptomyces* spp. Lym 3.1, Lym 3.2 і Lym 3.3 за дії катіонів нікелю у концентраціях 0,001 моль/л – 0,05 моль/л. Про вплив важких металів на продукцію пігментів зазначено у публікації Poornam Sharma et al. [21], у якій показано, що  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Pb}^{2+}$  у концентраціях 0,1 мМ підвищують синтез меланіну, у той же час як  $\text{Mn}^{2+}$  має зворотній ефект. В інших дослідженнях наводяться дані щодо пригнічення пігментоутворення стрептоміцетами за дії  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  і  $\text{Cu}^{2+}$  в концентраціях нижчих за МІК [15].

У загальному вигляді, аналізуючи отримані результати з урахуванням проміжних і остаточних даних, рівнів чутливості, розмірів зон відсутності росту, у порядку зменшення токсичної дії на виділені із обростань черепашнику штами актинобактерій використані катіони важких металів можна розташувати у ряд:  $\text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ . Для актинобактерій із мідій цей ряд має такий порядок:  $\text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ .

Дія металу може виявлятися по-різному. В окремих випадках відбувається тривала затримка росту, після якої швидкість росту і кінцева біомаса досягають величин як за відсутності металу. В інших тривалість lag-фази не збільшується, проте швидкість росту та кількість біомаси нижчі, ніж у контролі. Встановлено, що в деяких випадках низькі концентрації металу стимулюють ріст та активність метаболічних процесів, а у більш високих концентраціях стають токсичними [9, 13]. Тому важливим у практичному відношенні є питання про можливі критичні концентрації важких металів, що має вирішуватися для кожного виду мікроорганізму та металу окремо.

Визначення рядів чутливості досліджених актинобактерій підтвердило таке ранжування катіонів важких металів за токсичністю їх дії і дозволило встановити МІК для кожного штаму (табл. 1, 2).

Так, МІК  $\text{Cd}^{2+}$  для усіх виділених штамів (за виключенням *Streptomyces* sp. Lym 9.2 і *Streptomyces* sp. Myt 5) становила 0,001 моль/л. Така чутливість до кадмію, на нашу думку, є підтвердження його високої токсичності і свідченням відсутності у досліджених штамів актинобактерій механізмів стійкості до цього важкого металу. З урахуванням отриманих даних, актинобактерії, як одні із членів морського мікробіому, можна розглядати як біоіндикатори забруднення морської екосистеми кадмієм, оскільки вони набагато чутливіші до стресу, ніж макроорганізми і досить швидко реагують на відповідні зміни [24].

Мінімальна інгібуюча концентрація  $\text{Cu}^{2+}$  для актинобактерій із черепашнику склала 0,001 моль/л – 0,05 моль/л, а для актинобактерій із мідій – 0,001 моль/л – 0,01 моль/л в залежності від штаму. Найвища стійкість до купруму (МІК 0,05 моль/л) встановлена для *Streptomyces* sp. Lym 5.1 і *Streptomyces* sp. Lym 10. При поясненні високих рівнів МІК купруму щодо стрептоміцетів наводиться припущення, що на ранньому етапі впливу купрум



Таблиця 1  
**Мінімальні інгібуючі концентрації металів (моль/л) для штамів актинобактерій,  
 виділених із обростань черепашнику**

Table 1  
**Minimum inhibitory concentrations of metals (mol/l) for actinobacteria strains  
 isolated from shell rock**

Штам	Cd <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 2.1	0,001	0,001	0,001	0,001	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 2.2	0,001	0,001	0,001	0,010	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 3.1	0,001	0,010	0,500	0,010	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 3.2	0,001	0,010	0,100	0,100	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 3.3	0,001	0,001	0,001	0,010	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 3.4	0,001	0,001	0,050	0,050	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 4	0,001	0,001	0,001	0,100	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 5.1	0,001	0,050	0,050	0,500	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 5.2	0,001	0,010	0,010	0,050	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 6.1	0,001	0,001	0,050	0,050	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 6.2	0,001	0,010	0,010	0,050	1,0
<i>Nocardiosis</i> sp. Lym 7.1	0,001	0,010	0,001	0,001	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 7.2	0,001	0,001	0,001	0,001	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 9.1	0,001	0,001	0,001	0,001	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 9.2	0,010	0,010	0,001	0,001	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 10	0,001	0,050	0,001	0,100	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 12.1	0,001	0,001	0,100	0,001	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 12.2	0,001	0,001	0,050	0,500	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym 12.3	0,001	0,001	0,001	0,001	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Lym Sb	0,001	0,010	0,001	0,100	1,0



Таблиця 2

Мінімальні інгібуючі концентрації металів (моль/л) для штамів актинобактерій, виділених із мідій

Table 2

Minimum inhibitory concentrations of metals (mol/l) for strains of actinobacteria isolated from mussels

Штам	Cd <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 1	0,001	0,001	0,001	0,050	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 2	0,001	0,010	0,010	0,100	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 3a	0,001	0,001	0,010	0,010	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 3b	0,001	0,001	0,001	0,050	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 4	0,001	0,001	0,001	0,001	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 5	0,010	0,001	0,001	0,001	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 6	0,001	0,001	0,001	0,001	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 7ch	0,001	0,001	0,100	0,001	0,5
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 7b	0,001	0,001	0,050	0,001	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 8	0,001	0,010	0,010	0,001	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 10	0,001	0,001	0,001	0,001	>1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 11	0,001	0,001	0,001	0,001	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 12a	0,001	0,001	0,050	0,050	1,0
<i>Streptomyces</i> sp. Myt 12b	0,001	0,001	0,050	0,050	>1,0

проникає в клітину для забезпечення фізіологічних потреб мікроорганізму, але незабаром після того, як метал досяг токсичних рівнів, індукується механізм еффлюксу. Така поведінка відзначається в інших стійких до купруму мікроорганізмів, таких як *Pseudomonas syringae*, *Escherichia coli* і *Enterococcus hirae* [8].

Мінімально інгібуючі концентрації Co<sup>2+</sup> і Ni<sup>2+</sup> для штамів актинобактерій, виділених із обростань черепашнику, визначені у межах 0,001 моль/л – 0,5 моль/л, для штамів із мідій – 0,001 моль/л – 0,1 моль/л. Як до купруму, так і до кобальту, і до нікелю більше стійкіших штамів серед актинобактерій із черепашнику. Максимальну стійкість до катіонів кобальту і катіонів нікелю проявили штами *Streptomyces* sp. Lym 3.1 і *Streptomyces* sp. Lym 12.2, відповідно.





Для більшості штамів, виділених із обростань черепашнику, значення МІК  $Zn^{2+}$  перевищило 1,0 моль/л. Актинобактерії з мідій були дещо чутливіші і для них МІК цинку визначена у межах 0,5 моль/л – <1,0 моль/л у залежності від штаму. Висока стійкість до цинку може розглядатися як перспективна характеристика виділених штамів актинобактерій у розробці біотехнологій вилучення або зменшення концентрації цього важкого металу у довкіллі.

Таким чином, проведені дослідження щодо визначення чутливості актинобактерій, виділених із обростань природного черепашнику і мідій Одеської затоки Чорного моря, до п'яти важких металів показали, що цей показник залежить від джерела виділення, штаму актинобактерій, типу металу, його концентрації. Загалом актинобактерії, виділені з мідій, є чутливішими до  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ніж актинобактерії з черепашнику. Усі досліджені штами виявилися високочутливими до  $Cd^{2+}$  (МІК  $Cd^{2+}$  майже для усіх штамів склала 0,001 моль/л) і стійкі до  $Zn^{2+}$  у концентраційному діапазоні 0,001 моль/л – 0,5 моль/л.

I.V. Strashnova, K.S. Potapenko, N.Yu. Vasylieva,  
N.V. Korotaeva, I.P. Metelitsyna

Odesa I.I. Mechnikov National University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,  
e-mail: fabiyanska@ukr.net

## SENSITIVITY TO HEAVY METALS OF ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM THE BIOLOGICAL FOULING OF SHELL ROCK AND MUSSELS OF THE ODESA GULF OF THE BLACK SEA

### Summary

*Environmental pollution with heavy metals/metalloids is one of the most important environmental problems, which leads to the development of bioremediation strategies and the search for biomarkers to assess its condition. **Aim.** To determine the sensitivity to heavy metals of actinobacteria isolated from the biological fouling of natural shell rock and mussels of the Odesa gulf of the Black Sea. **Methods.** Thirty-four strains of actinobacteria isolated from fouling of shell rock and mussels of the Odesa gulf were used in the investigation. The sensitivity of the studied bacteria to heavy metal cations was determined on starch-casein agar by the disk diffusion method. Discs impregnated with salts solutions of  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  in concentrations of 0.001 mol/l, 0.01 mol/l, 0.05 mol/l, 0.1 mol/l, 0.5 mol/l and 1.0 mol/l were used. **Results.** The investigated actinobacteria showed variable sensitivity to heavy metals, which depended on the source of isolation, strain, type of metal and its concentration. All tested bacteria were most sensitive to  $Cd^{2+}$  (MIC was 0.001 mol/l), the most resistant to  $Zn^{2+}$  (MIC was higher than 1.0 mol/l for the vast majority of bacteria). At concentrations lower than the MIC, zinc stimulated the formation of aerial mycelium of almost all strains, and pigment formation increased in some of them. The sensitivity to heavy metals of actinobacteria isolated from shellfish decreased in the following sequence:  $Cd^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+}$ , and in actinobacteria isolated from mussels –  $Cd^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+}$ . **Conclusions.** Actinobacteria isolated from mussels are more sensitive to cadmium,*





*cuprum, cobalt, nickel and zinc, compared with actinobacteria from shell rock. All studied strains were highly sensitive to Cd<sup>2+</sup> (MIC Cd<sup>2+</sup> for almost all strains was 0.001 mol/l) and resistant to Zn<sup>2+</sup> in the concentration range of 0.001 mol/l – 0.5 mol/l.*

*Key words: marine actinobacteria, sensitivity, heavy metals*

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Блайда І.А., Васильєва Т.В., Слюсаренко Л.І., Васильєва Н.Ю. Стійкість до важких металів ацидофільних хемолітотрофних бактерій, що виділені з техногенної сировини // Мікробіологія і біотехнологія. – 2019. – № 1 (45). – С. 24–35. [рос.]. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.1\(45\).159902](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.1(45).159902)
2. Васильєва Н.Ю., Слюсаренко Л.І., Васильєва Т.В. Акумуляція Cu(II) морськими нейтрофільними тіоновими бактеріями // Мікробіологія і біотехнологія. – 2019. – № 1 (45). – С. 56–68. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.1\(45\).164171](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.1(45).164171)
3. Васильєва Н.Ю., Страшнова І.В., Васильєв М.А., Метеліцина І.П. Стійкість бактерій роду *Lactobacillus*, ізольованих з чорноморських губок, до антибіотиків і важких металів // Мікробіологія і біотехнологія. – 2019. – № 3 (47). – С. 58–77. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.3\(47\).186592](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.3(47).186592)
4. Іутинська Г.О., Петруша З.В., Васильєва Т.В., Сопліна О.М. Токсичність і мутагенність важких металів – забруднювачів ґрунту // Современные проблемы токсикологии. – 2000. – № 2. – С. 53–56.
5. Коротаєва Н.В., Страшнова І.В., Васильєва Н.Ю., Потапенко К.С., Метеліцина І.П., Філіпова Т.О., Іваниця В.О. Характеристика актинобактерій, ізольованих із *Mytilus galloprovincialis* Одеської затоки Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2021. – № 3 (53). – С. 84–98. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3\(53\).246392](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).246392)
6. Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С. Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2007. – Вип. 45. – С. 3–28.
7. Страшнова І.В., Коротаєва Н.В., Потапенко К.С., Васильєва Н.Ю., Чабан М.М., Штеніков М.Д., Лісютін Г.В., Іваниця В.О. Актинобактерії обростання твердих субстратів Одеської затоки Чорного моря // Морський екологічний журнал. – 2021. – № 2. – С. 71–82. doi: <https://doi.org/10.47143/1684-1557/2021.2.07>
8. Albarracín V.H., Ávila A.L., Amoroso M.J., Abate C.M. Copper removal ability by *Streptomyces* strains with dissimilar growth patterns and endowed with cupric reductase activity // FEMS Microbiology Letters. – 2008. – Vol. 288 (2). – P. 141–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01335.x>
9. Alvarez A., Saez J.M., Costa J.S.D., Colin V.L., Fuentes M.S., Cuzzo S.A. *Actinobacteria*: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals // Chemosphere. – 2017. – Vol. 166. – P. 41–62. doi: [10.1016/j.chemosphere.2016.09.070](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.070)



10. Choi S-H., Lee K-L., Shin J-H., Cho Y-B., Cha S-S., Roe J-H. Zinc-dependent regulation of zinc import and export genes by Zur // Nature Communications. – 2017. – Vol. 8. – P. 1–11. doi: 10.1038/ncomms15812
11. Cimermanova M., Pristas P., Piknova M. Biodiversity of *Actinomycetes* from heavy metal contaminated technosols // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9 (8). – P. 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081635>
12. El Baz S., Baz M., Barakate M., Hassani L., El Gharmali A., Imziln B. Resistance to and accumulation of heavy metals by *Actinobacteria* isolated from abandoned mining areas // The Scientific World Journal. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–15. <https://doi.org/10.1155/2015/761834>
13. El Baz S. Bioremediation of heavy metal by actinobacteria: review // Am. J. innov. res. appl. sci. – 2017. – Vol. 5 (5). – P. 359–369. [www.american-jiras.com](http://www.american-jiras.com)
14. Igiri B.I., Okoduwa S.I.R., Idoko G.O., Akabuogu E.P., Adeyi A.O., Ejiogu I.K. Toxicity and bioremediation of heavy metals contaminated ecosystem from tannery wastewater: a review // Journal of Toxicology. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1–17. <https://doi.org/10.1155/2018/2568038>
15. Jastaniah S.D., Aburas M.M.A. Effects of some heavy metals on growth, protein content and pigment production by *Streptomyces coelicolor* SM1 // Biosci. Biotech. Res. Asia. – 2016. – Vol. 13 (4). – P. 1975–1981. doi: <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2352>
16. Junpradit C., Thooppeng P., Duangmal K., Prapagdee B. Influence of cadmium-resistant *Streptomyces* on plant growth and cadmium uptake by *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Jacques // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2021. – Vol. 28. – P. 39398–39408. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13527-z>
17. Karczewska A., Lewińska K. The response of the soil microbiome to contamination with cadmium, cobalt and nickel in soil sown with *Brassica napus* // Minerals. – 2021. – Vol. 11 (5). – P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/min11050498>
18. Kosiorek M., Wyszowski M. Effect of cobalt on environment and living organisms – a review // Applied ecology and environmental research. – 2019. – Vol. 17 (5). – P. 11419–11449. doi: [http://dx.doi.org/10.15666/aer/1705\\_1141911449](http://dx.doi.org/10.15666/aer/1705_1141911449)
19. Presentato A., Piacenza E., Turner J.R., Zannoni D., Cappelletti M. Processing of metals and metalloids by *Actinobacteria*: cell resistance mechanisms and synthesis of metal(loid)-based nanostructures // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8 (12). – P. 1–37. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122027>
20. Remenár M., Karellová E., Harichová J., Zámocký M., Krčová K., Feriánc P. *Actinobacteria* occurrence and their metabolic characteristics in the nickel-contaminated soil sample // Biologia. – 2014. – Vol. 69 (11). – P. 1453–1463. doi: 10.2478/s11756-014-0451-z.
21. Sharma P., Singh T.A., Bharat B., Bhasin S., Modi H.A. Approach towards different fermentative techniques for the production of bioactive actinobacterial melanin // Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. – 2018. – Vol. 7. – P. 695–700. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.08.002>



22. Singh S., Pandey S., Chaudhary H.S. *Actinomycetes*: tolerance against heavy metals and antibiotics // *Int. J. Bioassays*. – 2014. – Vol. 3 (10). – P. 3376–3383. [www.ijbio.com](http://www.ijbio.com)
23. Timková I., Sedláková-Kaduková J., Pristaš P. Biosorption and bioaccumulation abilities of *Actinomycetes*/*Streptomyces* isolated from metal contaminated sites // *Separations*. – 2018. – Vol. 5 (54). – P. 1–14. doi:10.3390/separations5040054
24. Yu X., Zhao J.T., Liu X., Sun L.X., Tian J., Wu N. Cadmium pollution impact on the bacterial community structure of arable soil and the isolation of the cadmium resistant bacteria // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698834>

## REFERENCES

1. Blyda IA, Vasylieva TV, Sliusarenko LI, Vasylieva NYu. Resistance of acidophilic chemolytrophic bacteria isolated from technogenic raw materials to heavy metals. *Microbiology and biotechnology*. 2019; 1(45): 24–35. [in Russian]. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.1\(45\).159902](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.1(45).159902)
2. Vasylieva NYu, Sliusarenko LI, Vasylieva TV. Cu(II) accumulation by marine neutrophil sulfur-oxidizing bacteria. *Microbiology and biotechnology*. 2019; 1(45): 56–68. [in Ukrainian]. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.1\(45\).164171](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.1(45).164171)
3. Vasylieva NYu, Strashnova IV, Vasyliiev MA, Metelitsyna IP. Resistance of *Lactobacillus* strains isolated from the Black Sea sponges to antibiotics and heavy metals. *Microbiology and biotechnology*. 2019; 3(47): 58–77. [in Ukrainian]. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.3\(47\).186592](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.3(47).186592)
4. Iutynska GO, Petruscha ZV, Vasylieva TV, Soplina OM. Toxicity and mutagenicity of heavy metals – soil pollutants. *Sovremennii problemi toksikologii*. 2000; 2: 53–56. [in Ukrainian].
5. Korotaeva NV, Strashnova IV, Vasylieva NYu, Potapenko KS, Metelitsyna IP, Filipova TO, Ivanytsia VO. Characteristics of actinobacteria from *Mytilus galloprovincialis* of Odesa gulf of the Black Sea. *Microbiology and biotechnology*. 2021; 3(53): 84–98. [in Ukrainian]. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3\(53\).246392](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).246392)
6. Kushkevych I, Hnatush S, Gudzh S. Influence of heavy metals on microorganisms' cells. *Visnyk of Lviv. un-tu. Biology series*. 2007; 45: 3–28. [in Ukrainian].
7. Strashnova IV, Korotaeva NV, Potapenko KS, Vasylieva NYu, Chaban MM, Shtenikov MD, Lisyutin GV, Ivanytsia VO. Actinobacteria of growth of solid substrates of the Odesa gulf of the Black Sea. *Marine ecological journal*. 2021; 2: 71–82. [in Ukrainian]. doi: <https://doi.org/10.47143/1684-1557/2021.2.07>
8. Albarracín VH, Ávila AL, Amoroso MJ, Abate CM. Copper removal ability by *Streptomyces* strains with dissimilar growth patterns and endowed with cupric reductase activity. *FEMS Microbiology Letters*. 2008; 288(2): 141–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01335.x>
9. Alvarez A, Saez JM, Costa JSD, Colin VL, Fuentes MS, Cuzzo SA. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides



- and heavy metals. *Chemosphere*. 2017; 166: 41–62. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.070
10. Choi S-H, Lee K-L, Shin J-H, Cho Y-B, Cha S-S, Roe J-H. Zinc-dependent regulation of zinc import and export genes by *Zur*. *Nature Communications*. 2017; 8: 1–11. doi: 10.1038/ncomms15812
  11. Cimermanova M, Pristas P, Piknova M. Biodiversity of Actinomycetes from heavy metal contaminated technosols. *Microorganisms*. 2021; 9 (8): 1 – 12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081635>
  12. El Baz S, Baz M, Barakate M, Hassani L, El Gharmali A, Imziln B. Resistance to and accumulation of heavy metals by Actinobacteria isolated from abandoned mining areas. *The Scientific World Journal*. 2015; 2015: 1–15. <https://doi.org/10.1155/2015/761834>
  13. El Baz S. Bioremediation of heavy metal by actinobacteria: review. *Am. J. innov. res. appl. sci*. 2017; 5 (5): 359–369. [www.american-jiras.com](http://www.american-jiras.com)
  14. Igiri BI, Okoduwa SIR, Idoko GO, Akabuogu EP, Adeyi AO, Ejiogu IK. Toxicity and bioremediation of heavy metals contaminated ecosystem from tannery wastewater: a review. *Journal of Toxicology*. 2018; 2018: 1–17. <https://doi.org/10.1155/2018/2568038>
  15. Jastaniah SD, Aburas MMA. Effects of some heavy metals on growth, protein content and pigment production by *Streptomyces coelicolor* SM1. *Biosci. Biotech. Res. Asia*. 2016; 13 (4): 1975–1981. doi: <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2352>
  16. Junpradit C, Thooppeng P, Duangmal K, Prapagdee B. Influence of cadmium-resistant Streptomyces on plant growth and cadmium uptake by *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Jacques. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021; 28: 39398–39408. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13527-z>
  17. Karczewska A, Lewińska K. The response of the soil microbiome to contamination with cadmium, cobalt and nickel in soil sown with *Brassica napus*. *Minerals*. 2021; 11 (5): 1–16. <https://doi.org/10.3390/min11050498>
  18. Kosiorek M, Wyszowski M. Effect of cobalt on environment and living organisms - a review. *Applied ecology and environmental research*. 2019; 17 (5): 11419–11449. doi: [http://dx.doi.org/10.15666/aer/1705\\_1141911449](http://dx.doi.org/10.15666/aer/1705_1141911449)
  19. Presentato A, Piacenza E, Turner JR, Zannoni D, Cappelletti M. Processing of metals and metalloids by Actinobacteria: cell resistance mechanisms and synthesis of metal(loid)-based nanostructures. *Microorganisms*. 2020; 8 (12): 1–37. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122027>
  20. Remenár M, Karelóvá E, Harichová J, Zámocký M, Krčová K, Ferianc P. Actinobacteria occurrence and their metabolic characteristics in the nickel-contaminated soil sample. *Biologia*. 2014; 69 (11): 1453–1463. doi: 10.2478/s11756-014-0451-z.
  21. Sharma P, Singh TA, Bharat B, Bhasin S, Modi HA. Approach towards different fermentative techniques for the production of bioactive actinobacterial melanin. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2018; 7: 695–700. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.08.002>
  22. Singh S, Pandey S, Chaudhary HS. Actinomycetes: tolerance against heavy metals and antibiotics. *Int. J. Bioassays*. 2014; 3 (10): 3376–3383. [www.ijbio.com](http://www.ijbio.com)



23. Timková I, Sedláková-Kaduková J, Pristaš P. Biosorption and bioaccumulation abilities of Actinomycetes/Streptomyces isolated from metal contaminated sites. *Separations*. 2018; 5 (54): 1–14. doi:10.3390/separations5040054
24. Yu X, Zhao JT, Liu X, Sun LX, Tian J, Wu N. Cadmium pollution impact on the bacterial community structure of arable soil and the isolation of the cadmium resistant bacteria. *Front. Microbiol.* 2021; 12: P. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698834>

Стаття надійшла до редакції 15.07.2022 р.





УДК 597.8

**С.Я. Комплікевич<sup>1</sup>, О.Д. Масловська<sup>1</sup>, Н.П. Менів<sup>1,2</sup>,  
Н.М. Кулішко<sup>1</sup>, О.Р. Іщак<sup>1</sup>, С.О. Гнатуш<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,  
тел.: +38(032) 239 40 53, e-mail: svtlana.hnatush@lnu.edu.ua<sup>2</sup>Львівська медична академія імені Андрея Крупинського,  
вул. Дорошенка, 70, Львів, 79000, Україна

## **ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ CITROBACTER SP. SR35 З ПОРОДНОГО ВІДВАЛУ ВУГІЛЬНОЇ ШАХТИ**

Бактерії роду *Citrobacter* є в ґрунті, воді, кишковому тракті тварин, клінічних зразках людини (сеча, мокротиння, кров, виділення з ран тощо), а також у стічних водах і відвалах шахт. Из породи відвалу шахти «Надія» Червоноградського гірничопромислового району (Львівська область, Україна) були виділені грамнегативні бактерії SR35, які здатні відновлювати сірку і сульфат-йони. **Метою** роботи було ідентифікувати та дослідити морфологічні і фізіолого-біохімічні властивості (форма клітин, розміри, фарбування за Грамом, спороутворення, рухливість, відношення до кисню, здатність до утворення  $H_2S$ , використання джерел карбону, каталазна активність, оксидазна активність) ізоляту SR35. **Методи.** У роботі використовували стандартні мікробіологічні і біохімічні методи досліджень (культуральний, методи мікроскопування, визначення амілазної, ліпазної активності). Хромосому ДНК виділяли методом м'якого лізису. Ген 16S рРНК ампліфікували із використанням універсальних праймерів 27F і 1492R. Секвенували методом Сенджера. Філогенетичну реконструкцію здійснювали у програмі MEGA X. Ідентифікацію ізолятів проводили на основі визначення послідовності гена 16S рРНК і фізіолого-біохімічних властивостей. **Результати.** Досліджені бактерії – палички (0,5–0,8×1,5–2,0 мкм), які формують ланцюжки і здатні відновлювати нітрат-, сульфат-йони та асимілювати низку джерел карбону. Глюкозу, лактозу, манозу, манітол та інозитол зброджують із утворенням кислоти. Рухомі. Каталазопозитивні, оксидазонегативні. Утворюють  $H_2S$  за росту на середовищі Кліглера. За результатами попарного вирівнювання послідовності гена 16S рРНК виділеного ізоляту встановлено найвищий відсоток ідентичності з представниками роду *Citrobacter* (99,23–99,86% ідентичності, покриття 98%) та підтверджено філогенетичною реконструкцією. Бактерії *Citrobacter* sp. SR35 є стійкими до 2 мкМ кадмію (II), 5 мМ феруму (II), 0,25 мМ кобальту (II), 10 мМ мангану (II), 0,5 мМ купруму (II) та 0,1 мМ хрому (VI). **Висновки.** За результатами секвенування гена 16S рРНК (номер доступу GenBank OP279754) та фізіолого-біохімічними ознаками (оксидаза, каталаза, використання джерел карбону, утворення  $H_2S$  тощо) встановлено приналежність ізоляту SR35 до роду *Citrobacter*.

**Ключові слова:** *Citrobacter*, відвали вугільних шахт, сульфатвідновлювальні бактерії



Бактерії роду *Citrobacter* є в ґрунті, воді, стічних водах, кишковому тракті тварин і в клінічних зразках людини (сеча, мокротиння, кров, виділення з ран тощо). Раніше їх вважали забруднювачами навколишнього середовища або колонізаторами з низькою вірулентністю, тепер відомо, що вони спричиняють широкий спектр інфекцій, які вражають сечовивідні шляхи, печінку, жовчовивідні шляхи, очеревину, кишечник, кістки, дихальні шляхи, ендокард, рани, м'які тканини, мозкові оболонки, кровотік [12, 16]. Рід *Citrobacter* запропонований у 1932 році Werkman і Gillen [4]. До 1993 року було визнано лише три види: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri* (раніше *Citrobacter diversus*) і *Citrobacter amalonaticus*. Пізніше було описано ще 13 [4]. *C. freundii* є типовим видом цього роду. У довкіллі *C. freundii* зазвичай є представником ґрунтового мікробіому. Бактерії *C. freundii* є нетрадиційними сульфатвідновлювальними бактеріями, які окрім організму людини виділяють з інших біотопів, зокрема техногенно-створених: кислих дренажних вод шахт, із відвалів видобутку золота, відвалів вугільних шахт тощо [5, 19, 22]. Деякі штами *C. freundii* мають важливе значення у процесах вилучення із стічних вод талію, купрум [22, 23], можуть утворювати 1,3-пропандіол та 2,3-бутандіол з гліцеролу [8, 13], здатні до екзоелектрогенезу [10]. За умов обмеженої аерації бактерії *Citrobacter freundii* M1-31.1/1, виділені з річкового мулу, внаслідок неспецифічної взаємодії з ферумом впливають на перетворення його сполук [6].

У породах відвалів Червоноградського гірничо-промислового району вміст сірки коливається від 28–91 мг/кг породи [2]. У процесі колообігу сполук сульфуру задіяні мікроорганізми, які є у породах – сірко- та сульфатвідновлювальні бактерії. Із породи відвалу шахти «Надія» Червоноградського гірничо-промислового району (Львівська область, Україна) нами були виділені грамнегативні бактерії SR35, які здатні відновлювати сірку і сульфат-йони і виявляли властивості роду *Citrobacter*. Метою роботи було ідентифікувати та дослідити морфологічні і фізіолого-біохімічні властивості ізоляту SR35.

### Матеріали і методи

Нагромаджувальну культуру сірковідновлювальних бактерій отримували із зразків породного відвалу шахти «Надія» (вершина, незадернована червона порода). Наважку породи 1 г вносили у 10 мл стерильного фізіологічного розчину і робили розведення. Суспензію висівали на чашки Петрі з середовищем Постгейта С, в яке замість  $\text{SO}_4^{2-}$  вносили еквімолярну кількість  $\text{S}^0$  (32 мМ) ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5 г;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1,0 г;  $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,06 г;  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,055 г;  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  – 6,0 г; дріжджовий екстракт – 1,0 г;  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  – 0,3 г; дистильована вода – до 1000 мл; рН 7,0–7,5) і вирощували в мікроанаеростаті із двома газогенераторними пакетами GENbox anaer (bioMerieux, Франція) за температури +28 °С упродовж 3–14 діб. Для підтвердження умов анаеробіозу використовували індикатор анаеробних умов Anaer Indicator (bioMerieux, Франція). Виділення ізолятів сірковідновлювальних бактерій із нагромаджувальних культур проводили за інтенсивністю забарвлення колоній унаслідок утвореного ними FeS за росту в середовищі Постгейта С із сіркою. Чисті культури отримували в результаті багаторазових пересівів окремих колоній. Чи-



стоту культури контролювали з використанням світлового мікроскопа (Carl Zeiss Axio Lab.A1,  $\times 1000$ ). Потім виділений ізолят культивували на триптон-соєвому агарі (Merck, USA) за температури  $+28\text{ }^\circ\text{C}$  упродовж 5 діб. Ідентифікацію ізоляту проводили, використовуючи морфологічні, фізіолого-біохімічні властивості та результати секвенування гена 16S рРНК. Форму та розмір клітин, тип клітинної стінки встановлювали за використання методів світлової мікроскопії (бінокулярний мікроскоп Carl Zeiss Axio Lab.A1,  $\times 1000$ ), рухомість – за методом Шукевича. Каталазну активність виявляли за появою бульбашок  $\text{O}_2$  після нанесення на колонію ізоляту кількох крапель 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$  [1].

Оксидазну активність виявляли із використанням смужок, насичених N,N-диметил-п-фенілендіамін оксалату та  $\alpha$ -нафтолу (Millipore, USA). Відношення до кисню визначали за характером росту у напіврідкому тіогліколевому середовищі. Здатність використовувати цитрат як єдине джерело карбону визначали на цитратному агарі Крістенсена, а ферментувати глюкозу, лактозу, утворювати  $\text{H}_2\text{S}$  досліджували за характером росту на середовищі Кліглера (Merck, USA). Для дослідження здатності бактерій метаболізувати різні джерела карбону використовували тест-систему ID 32 GN (bioMérieux, France). Здатність бактерій ферментувати різні джерела карбону виявляли упродовж росту у середовищах Гісса з арабінозою, глюкозою, дульцитом, інозитом, ксилозою, лактозою, мальтозою, манітом, манозою, рамнозою, сахарозою, сорбітом. Здатність відновлювати нітрати визначали із застосуванням реактиву Гріса-Айлосвая (Merck, USA) після росту на нітратному бульйоні, фіксувати молекулярний азот – за ростом на середовищі Ешбі [1]. Для дослідження здатності до нітрифікації бактерії вирощували на середовищі Виноградського для I та II фази нітрифікації [1]. Амілазну активність оцінювали за ростом на крохмально-аміачному агарі та утворенням видимих зон гідролізу крохмалю після нанесення розчину Люголя на колонії [1]. Ліпазну активність оцінювали за здатністю ізоляту утворювати кристали кальцієвих солей жирних кислот навколо колоній після росту на середовищі з твіном-20 [1]. Для дослідження стійкості ізоляту до солей важких металів у середовище R2A (Merck, USA) вносили  $\text{CdCl}_2 \times 2,5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  та  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  для отримання концентрацій 2–200 мкМ кадмію (II), 1–25 мМ мангану (II), 1–25 мМ феруму (II), 0,05–1 мМ кобальту (II), 0,05–1 мМ купрум (II), 0,01–2 мМ хрому (VI).

Сумарну ДНК виділяли із 1 мл культури вирощеної в триптон-соєвому бульйоні (Merck, USA) за  $29\text{ }^\circ\text{C}$  упродовж 48 годин. Культуру осаджували центрифугуванням. Виділення сумарної ДНК проводили методом м'якого лізису [7]. Виділену ДНК візуально виявляли методом електрофоретичного розділення та зберігали за температури  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . 16S рДНК ампліфікували зі сумарної ДНК штаму за допомогою універсальних праймерів 27F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG та 1492R GGTTACCTTGTTACGACTT [20]. Амплікон (прибл. 1,5 т.п.н.) очищували за допомогою набору «QiaQuick» («Qiagen», США) і далі секвенували методом Сенджера на ABI PRISM 3130 x1 з використанням Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit та вище зазначених праймерів. Послідовності збирали з допомогою програми Geneious (Biomatters, Ltd, Нова Зеландія) та аналізували з допомогою BLASTn з ви-





користанням бази даних 16S рРНК (Bacteria and Archaea: 16S ribosomal RNA project, NI, США). Послідовність задепонували у базі даних GenBank (номер доступу OP279754).

Філогенетичний аналіз проводили у програмі MEGA X [11]. Множинне вирівнювання послідовностей здійснювали із використанням програми Clustal W [18], після чого вибирали найкращу модель для побудови філогенетичного дерева у MEGA X [11, 15]. Філогенетичну реконструкцію послідовностей здійснювали за методом найбільшої вірогідності із застосуванням моделі Hasegawa-Kishino-Yano [9].

### Результати дослідження та їх обговорення

Із зразків породних відвалів виділено 40 ізолятів, які утворювали чорні колонії за росту на середовищі Постгейта С з сіркою та сульфатом. Для роботи відібрали ізолят SR35, який найкраще ріс на середовищі Постгейта С. Досліджувані бактерії є факультативними анаеробами. Їхні клітини – дрібні грамнегативні палички ( $0,5-0,8 \times 1,5-2,0$  мкм), які формують ланцюжки. Рухомі. Каталазопозитивні, оксидазонегативні. Досліджені бактерії здатні відновлювати нітрат-, сульфат- йони та асимілювати N-ацетилглюкозамін, D-рибозу, інозитол, ацетат, L-серин, D-манітол, D-глюкозу, саліцин, L-гістидин, натрію цитрат, 2-кетоглюконат калію, L-пролін в аеробних умовах. Порівняння властивостей бактерій *Citrobacter* sp. SR35 з іншими описаними штамми роду *Citrobacter*, зокрема з типовим штамом *Citrobacter freundii* DSM 30039 [3] продемонструвало їхню відмінність від них (табл. 1).

За використання середовища Гісса встановили, що досліджені бактерії в мікроаеробних умовах ферментують глюкозу, лактозу, манозу, манітол та інозитол з утворенням кислоти і відрізняються від інших описаних штамів роду *Citrobacter*. За характером росту на середовищі Клігlera спостерігали утворення сірководню (табл. 2). Бактерії використовують цитрат як єдине джерело карбону на цитратному агарі Крістенсена. На середовищі Ешбі не ростуть. Здійснюють першу фазу нітрифікації. Крохмаль та твін-20 не розщеплюють.

За результатами попарного вирівнювання послідовності гена 16S рРНК виділеного штаму встановлено найвищий відсоток ідентичності з представниками роду *Citrobacter* (99,23–99,86% ідентичності, покриття 98%) та підтверджено філогенетичною реконструкцією (рис. 1).

Послідовність нуклеотидів гена 16S рРНК ізоляту SR35 (номер доступу GenBank OP279754) найбільш подібна до послідовності нуклеотидів цього гена бактерій *Citrobacter freundii* та розміщена разом з ними у одній кладі. Однак, на відміну від штамів *C. freundii* JCM 1657, *C. freundii* ATCC 8090 = MTCC 1658 = NBRC 12681 і *C. freundii* NBRC 12681 ізолят SR35 розташований на деякій філогенетичній відстані від основи класу, що вказує на суттєві відмінності і можливу його приналежність до іншого виду цього роду.

За морфологічними (форма клітин, рухомість тощо) і фізіологічними ознаками, зокрема, оксидазною та каталазною активностями, здатністю рости аеробно чи анаеробно, використовувати цитрат як єдине джерело карбону, зброджувати глюкозу з утворенням кислоти, утворювати  $H_2S$  за росту на середовищі Клігlera, а також враховуючи дані філогенетичної реконструкції



Таблиця 1

Порівняльна характеристика властивостей штаму *Citrobacter* sp. SR35  
з іншими штамами роду *Citrobacter*

Table 1

Comparative characteristics of the strain *Citrobacter* sp. SR35 properties  
with other strains of the genus *Citrobacter*

Ознака	<i>Citrobacter</i> sp. SR35	<i>Citrobacter</i> <i>freundii</i> DSM 30039 [3]	<i>Citrobacter</i> <i>sedlakii</i> [14]	<i>Citrobacter</i> <i>portucalensis</i> [17]	<i>Citrobacter</i> <i>arsenatis</i> [21]
Асиміляція:					
L-рамноза	–	+	+	+	+
N-ацетилглюкозамін	+	+	+	н/д	+
D-рибоза	+	+	+	+	+
Інозитол	+	+	+	+	н/д
D-сахароза	–	+	н/д	+	н/д
D-мальтоза	–	+	+	+	+
Ацетат натрію	+	н/д	н/д	н/д	н/д
Лактат	–	+	н/д	н/д	н/д
5-Кетоглюконат калію	–	+	–	+	+
3-Гідроксибензойна кислота	–	+	н/д	н/д	н/д
D-манітол	+	+	+	+	+
D-глюкоза	+	+	+	+	+
Саліцин	+	н/д	+	+	н/д
D-мелібіоза	–	+	н/д	+	+
L-фукоза	–	н/д	+	+	+
D-сорбітол	–	+	+	+	+
L-арабіноза	–	+	+	+	+
Пропіонова кислота	–	н/д	н/д	н/д	н/д
Натрій цитрат	+	+	+	+	–
2-Кетоглюконат калію	+	+	+	+	+
3-Гідроксибутират	–	+	н/д	н/д	н/д
L-пролін	+	+	н/д	н/д	н/д
Відновлення NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+	н/д	+	+	+
Утворення H <sub>2</sub> S	+	+	н/д	+	+

Примітка. «+» – є ознака, «–» – немає ознаки, «н/д» – немає даних.  
Notes: «+» – positive; «–» – negative; «n/d» – no data.



Таблиця 2

Порівняльна характеристика здатності до кислотоутворення штаму *Citrobacter* sp. SR35 з іншими штамами роду *Citrobacter* під час росту на різних джерелах карбону

Table 2

Comparison of the acid formation capacity of the strain *Citrobacter* sp. SR35 with other strains of the genus *Citrobacter* in growth period on different carbon sources

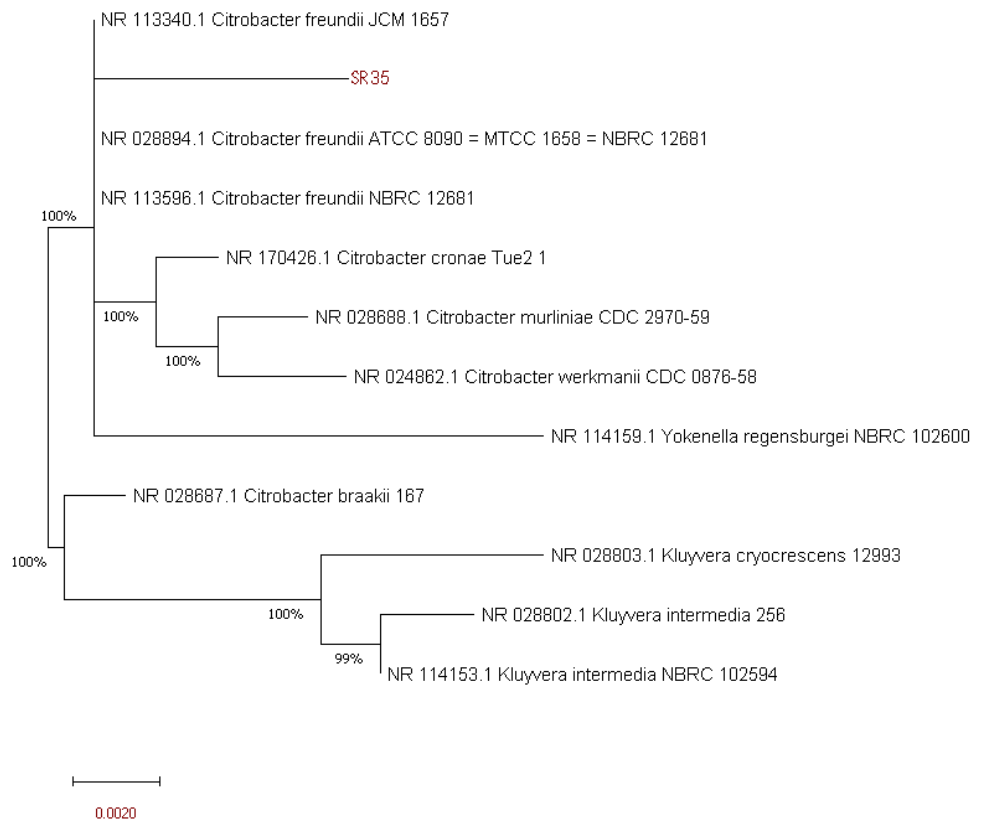
Властивість	<i>Citrobacter</i> sp. SR35	<i>Citrobacter freundii</i> DSM 30039 [3]	<i>Citrobacter sedlakii</i> [14]	<i>Citrobacter portucalensis</i> [17]	<i>Citrobacter arsenatis</i> [21]
Маноза	+	н/д	н/д	+	+
Лактоза	+	н/д	н/д	+	+
Мальтоза	–	+	н/д	+	+
Манітол	+	+	н/д	+	+
Глюкоза	+	+	н/д	+	+
Ксилоза	–	н/д	+	+	+
Арабіноза	–	+	н/д	–	+
Сорбітол	–	+	н/д	+	+
Сахароза	–	+	н/д	+	–
Інозитол	+	н/д	н/д	+	+
Дульцит	–	н/д	н/д	–	н/д

Примітка. «+» – утворення кислоти, «–» – кислоти не утворюють, «н/д» – немає даних.  
Notes: «+» – acid production; «–» – no acid; «n/d» – no data.

гена 16S рРНК, ізолят SR35 було ідентифіковано як *Citrobacter* sp. SR35. Цей штам відрізняється від типового штаму *C. freundii* DSM 30039 та інших представників *Citrobacter* здатністю використовувати або зброджувати деякі джерела карбону (мальтозу, ксилозу, арабінозу, сорбітол, сахарозу).

Вугілля Червоноградського гірничопромислового району (Львівська область, Україна) містить високий вміст сірки, тому багато її сполук є й у відвальній породі. Ця порода також містить значні концентрації важких металів у рухомій формі внаслідок низького рН [2]. Є повідомлення про виділення із техногенних територій стійких до важких металів бактерій роду *Citrobacter*. Деякі із цих штамів використовують для оптимізації процесів біоремедіації забруднених середовищ [22, 23]. Із відвалів видобутку золота був виділений штам *Citrobacter freundii* JPG1, який був стійкий до солей нікелю, кадмію, кобальту, хрому, купруму та аргентуму у концентраціях 0,06–4 мМ [22]. Виділені нами бактерії *Citrobacter* sp. SR35 є стійкими до 2 мкМ кадмію (II), 5 мМ феруму (II), 0,25 мМ кобальту (II), 10 мМ мангану (II), 0,5 мМ купруму (II) та 0,1 мМ хрому (VI) (табл. 3).





**Рис. 1.** Філогенетична реконструкція гена 16S рРНК ізоляту SR35 із найвищою логарифмічною правдоподібністю (-2415.12) методом максимальної вірогідності за моделлю Hasegawa-Kishino-Yano із 1000 бутстрєп реплікацій. Біля гілок подано значення відсотку дерев, у яких ці послідовності розміщені поряд

**Fig. 1.** Phylogenetic reconstruction of the gene 16S rRNA of isolate SR35 with the highest log-likelihood (-2415.12) by using the maximum probability method according to the Hasegawa-Kishino-Yano model with 1000 bootstrap replications. The values of the percentage of trees in which these sequences are located next to each other are given near the branches

Отже, із відвалів Червоноградського гірничопромислового району (Львівська область, Україна) виділені паличкоподібні, рухомі, факультативно-анаеробні, оксидазонегативні, каталазопозитивні бактерії SR35, які здатні використовувати цитрат як єдине джерело карбону, зброджувати глюкозу з утворенням кислоти, утворювати  $H_2S$ , відновлювати сірку, нітрат-, сульфат-йони та асимілювати низку джерел карбону. За морфологічними і фізіологічними ознаками, а також враховуючи дані філогенетичної реконструкції гена 16S рРНК, штамп SR35 ідентифіковано як *Citrobacter* sp. SR35. Бактерії *Citrobacter* sp. SR35 стійкі до 2 мкМ кадмію (II), 5 мМ феруму (II), 0,25 мМ кобальту (II), 10 мМ мангану (II), 0,5 мМ купруму (II) та 0,1 мМ хрому (VI) і відрізняються від описаних штамів роду за використанням певних джерел



Таблиця 3

Вплив сполук важких металів на ріст *Citrobacter* sp. SR35

Table 3

Effect of heavy metal compounds on the growth of *Citrobacter* sp. SR35

Метал	Концентрація	Ріст	Метал	Концентрація	Ріст
Кадмій (II), мкМ	1	+	Ферум (II), мМ	1	+
	2	+		5	+
	10	–		10	–
Кобальт (II), мМ	0,05	+	Манган (II), мМ	1	+
	0,1	+		5	+
	0,25	+		10	+
	0,5	–		15	–
Купрум (II), мМ	0,05	+	Хром (VI), мМ	0,025	+
	0,1	+		0,05	+
	0,25	+		0,075	+
	0,5	+		0,1	+
	0,75	–		0,25	–

Примітка. «+» – є ріст, «–» – немає росту.  
Notes: «+» – growth; «–» – no growth.

карбону, стійкістю до металів. За топологією філогенетичного дерева штам суттєво відмінний від інших штамів *Citrobacter freundii*. Отримані результати доповнюють дані про поширення та властивості бактерій роду *Citrobacter* у навколишньому середовищі.

Висловлюємо подяку працівникам ТОВ «Explogen» за секвенування гена 16S рРНК.

**S.Y. Komplikevych<sup>1</sup>, O.D. Maslovska<sup>1</sup>, N.P. Meniv<sup>1,2</sup>,  
N.M. Kulishko<sup>1</sup>, O.R. Ishchak<sup>1</sup>, S.O. Hnatush<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi Str., Lviv, 79005, Ukraine,  
tel.: +38(032) 239 40 53, e-mail: svitlana.hnatush@lnu.edu.ua

<sup>2</sup>Andrei Krupynskiy Lviv Medical Academy, Doroshenko Str., 70, Lviv, 79000, Ukraine

## ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF BACTERIA *CITROBACTER* SP. SR35 FROM A COAL MINE WASTE DUMP

### Summary

*Bacteria of the genus Citrobacter are found in soil, water, the intestinal tract of animals, human clinical samples (urine, sputum, blood, wound drainage, etc.), also in wastewaters and waste dumps of mines. Gram-negative bacteria SR35, capable*



of reducing sulfur and sulfate ions, were isolated from the waste dump of the Nadiya coal mine, Chervonograd Mining and Industrial district (Lviv region, Ukraine). **The work aimed** to identify and study morphological, physical and chemical properties (cell shape, size, Gram staining, sporulation, motility, oxygen requirements, ability to form H<sub>2</sub>S, utilization of carbon sources, catalase activity, oxidase activity) of isolate SR35. **Methods.** We used standard microbiological and biochemical research methods (microbial culture, microscopy methods, determination of amylase, lipase activity). Chromosomal DNA was isolated by the method of soft lysis. The 16S rRNA gene was amplified using universal primers 27F and 1492R. It was sequenced by the Sanger method. Phylogenetic reconstruction was performed using the MEGA X program. Identification of isolates was carried out based on both the sequence of the 16S rRNA gene and physiological and biochemical properties. **Results.** The studied bacteria are rods (0.5–0.8×1.5–2.0 μm), which form chains and are capable of reducing nitrate and sulfate ions and assimilating several carbon sources. Glucose, lactose, mannose, mannitol, and inositol are fermented with the formation of acid. Motile. Catalase positive, oxidase negative. Form H<sub>2</sub>S during growth in Kligler's medium. According to the results of pairwise alignment of the isolate's 16S rRNA gene sequence, the highest percentage of identity with representatives of the genus *Citrobacter* was established (99.23–99.86% identity, coverage 98%) and it was confirmed by phylogenetic reconstruction. *Citrobacter* sp. SR35 is resistant to 2 μM cadmium (II), 5 mM iron (II), 0.25 mM cobalt (II), 10 mM manganese (II), 0.5 mM copper (II), and 0.1 mM chromium (VI). **Conclusions.** According to the results of sequencing of the 16S rRNA (accession number GenBank OP279754) gene, and physiological, and biochemical characteristics (oxidase, catalase, metabolism of carbon sources, production of H<sub>2</sub>S, etc.), it was established that isolate SR35 belongs to the genus *Citrobacter*.

*Key words:* *Citrobacter*, coal mine tailings, sulfate-reducing bacteria

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Яворська Г.В., Білінська І.С., Борсукевич Б.М. Практикум з мікробіології. – Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2014. – 436 с.
2. Дяків С.В. Мікробні угруповання породних відвалів вугільних шахт та роль у їхньому функціонуванні сульфідогенних бактерій: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2019. – 24 с.
3. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://bacdiv.dsmz.de/strain/4325>
4. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://lpsn.dsmz.de/genus/citrobacter>
5. Alasvand Zarasvand K., Ravishankar Rai V. Identification of the traditional and non-traditional sulfate-reducing bacteria associated with corroded ship hull // 3 Biotech. – 2016. – 6, № 2. – P. 1–8. doi:10.1007/s13205-016-0507-6
6. Govorukha V.M., Tashyrev O.B. The regularities of iron compounds transformation by *Citrobacter freundii* ML-31. 1/1 // Mikrobiol. Z.– 2016. – 78, № 1. – С. 33–43.
7. Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning: Laboratory Manual. – 4<sup>th</sup> ed. – Cold Spring Harbor; New York, 2012. – 2028 p.
8. Güngörmüşler M. Production of value-added bioproducts using a modified





- continuous biofilm reactor by *Citrobacter freundii* DSM 15979 // Hittite J. Sci. Eng. – 2021. – 8, № 1. – P. 55–62. doi: 10.17350/HJSE19030000213
9. Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA // J. Mol. Evol. – 1985. – 22. – P. 160–174.
10. Huang J., Zhu N., Cao Y., Peng Y., Wu P., Dong W. Exoelectrogenic bacterium phylogenetically related to *Citrobacter freundii*, isolated from anodic biofilm of a microbial fuel cell // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2015. – 175, № 4. – P. 1879–1891. doi: 10.1007/s12010-014-1418-9
11. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. – 2018. – 35. – P. 1547–1549.
12. Liu L.H., Wang N.Y., Wu A.Y.J., Lin C.C., Lee C.M., Liu C.P. *Citrobacter freundii* bacteremia: risk factors of mortality and prevalence of resistance genes // J Microbiol Immunol Infect. – 2018. – 51, № 4. – P. 565–572. doi: 10.1016/j.jmii.2016.08.016
13. Maina S., Kachrimanidou V., Ladakis D., Papanikolaou S., de Castro A.M., Koutinas A. Evaluation of 1, 3-propanediol production by two *Citrobacter freundii* strains using crude glycerol and soybean cake hydrolysate // Environ Sci Pollut Res. – 2019. – 26, № 35. – P. 35523–35532. doi: 10.1007/s11356-019-05485-4
14. Mekonnen E., Kebede A., Tafesse T., Tafesse M. Investigation of carbon substrate utilization patterns of three ureolytic bacteria // Biocatal. Agric. Biotechnol. – 2019. – 22. – P. 101429. doi:10.1016/j.bcab.2019.101429
15. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. – Oxford University Press; New York, 2000. – 333 p.
16. Overview of Bacteria. In: Microbiology and molecular diagnosis in pathology. Eds. Wanger A., Chavez V., Huang R. S.P., Wahed A., Actor J. K., Dasgupta A. Elsevier, Netherlands, 2017: 75–117. doi: 10.1016/B978-0-12-805351-5.00006-5
17. Ribeiro T.G., Goncalves B.R., da Silva M. S., Novais A., Machado E., Carrico J. A., Peixe L. *Citrobacter portucalensis* sp. nov., isolated from an aquatic sample // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2017. – 67, № 9. – P. 3513–3517. doi: 10.1099/ijsem.0.002154
18. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. – 1994. – 22, № 22. – P. 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
19. Titilawo Y., Masudi W.L., Olawale J.T., Sekhohola-Dlamini L.M., Cowan A.K. Coal-degrading bacteria display characteristics typical of plant growth promoting rhizobacteria // Processes. – 2020. – 8, № 9. – P. 1111. doi: 10.3390/pr8091111
20. Turner S., Pryer K.M., Miao V.P.W., Palmer J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis // J. Eukaryot. Microbiol. – 1999. – 46, № 4. – P. 327–338.



21. Wang H., Hou H., Huang J. *Citrobacter arsenatis* sp. nov., an arsenate-reducing bacterium isolated from freshwater sediment // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2021. – 114, № 8. – P. 1285–1292. doi:10.1007/s10482-021-01601-y
22. Wang X., Huang N., Shao J., Hu M., Zhao Y., Huo M. Coupling heavy metal resistance and oxygen flexibility for bioremoval of copper ions by newly isolated *Citrobacter freundii* JPG1 // *J. Environ. Manage.* – 2018. – 226. – P. 194–200. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.08.042
23. Zhang H., Li M., Yang Z., Sun Y., Yan J., Chen D., Chen Y. Isolation of a non-traditional sulfate reducing-bacteria *Citrobacter freundii* sp. and bioremoval of thallium and sulfate // *Ecol. Eng.* – 2017. – 102. – P. 397–403. doi: 10.1016/j.ecoleng.2017.02.049

### REFERENCES

1. Hudz' SP, Hnatush SO, Yavorska HV, Bilinska IS, Borsukevych BM. Guidebook on microbiology. Lviv: Vyd. tsestr LNU imeni Ivana Franka, 2014. 436 p. (in Ukrainian)
2. Dyakiv SV. Microbial communities of coal pits waste heaps and sulfidogenic bacteria role in their functioning: Avtoref. dys. ... kand. biol. nauk. K., 2019. 24 p. (in Ukrainian)
3. Electronic resource – Available from: <https://bacdive.dsmz.de/strain/4325>
4. Electronic resource – Available from: <https://lpsn.dsmz.de/genus/Citrobacter>
5. Alasvand Zarasvand K, Ravishankar Rai V. Identification of the traditional and non-traditional sulfate-reducing bacteria associated with corroded ship hull. *3 Biotech*. 2016; 6(2):1–8. doi: 10.1007/s13205-016-0507-6
6. Govorukha VM, Tashyrev OB. The regularities of iron compounds transformation by *Citrobacter freundii* ML-31. 1/1 // *Mikrobiol. Z.* 2016; 78(1): 33–43.
7. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: Laboratory Manual*. (4th ed.). New York: Cold Spring Harbor, 2012. 2028 p.
8. Güngörmüşler M. Production of value-added bioproducts using a modified continuous biofilm reactor by *Citrobacter freundii* DSM 15979. *Hittite J. Sci. Eng.* 2021; 8(1): 55–62. doi:10.17350/HJSE19030000213
9. Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 1985;22: P. 160–174.
10. Huang J, Zhu N, Cao Y, Peng Y, Wu P, Dong W. Exoelectrogenic bacterium phylogenetically related to *Citrobacter freundii*, isolated from anodic biofilm of a microbial fuel cell. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2015;175(4): 1879–1891. doi:10.1007/s12010-014-1418-9
11. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018;35: P. 1547–1549.
12. Liu LH, Wang NY, Wu AYJ, Lin CC, Lee CM, Liu CP. *Citrobacter freundii* bacteremia: risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *J Microbiol Immunol Infect.* 2018;51(4): 565–572. doi: 10.1016/j.jmii.2016.08.016
13. Maina S, Kachrimanidou V, Ladakis D, Papanikolaou S, de Castro AM, Kouti-



- nas A. Evaluation of 1, 3-propanediol production by two *Citrobacter freundii* strains using crude glycerol and soybean cake hydrolysate. *Environ Sci Pollut Res.* 2019; 26(35): 35523–35532. doi:10.1007/s11356-019-05485-4
14. Mekonnen E, Kebede A, Tafesse T, Tafesse M. Investigation of carbon substrate utilization patterns of three ureolytic bacteria. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019;22: 101429. doi:10.1016/j.bcab.2019.101429
15. Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* New York: Oxford University Press, 2000. 333 p.
16. Overview of Bacteria. In: *Microbiology and molecular diagnosis in pathology.* Eds. Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A. Elsevier, Netherlands, 2017: 75–117. doi: 10.1016/B978-0-12-805351-5.00006-5
17. Ribeiro TG, Goncalves BR, da Silva MS, Novais A, Machado E, Carrico JA, Peixe L. *Citrobacter portucalensis* sp. nov., isolated from an aquatic sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017;67(9):3513–3517. doi: 10.1099/ijsem.0.002154
18. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(22): 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
19. Titilawo Y, Masudi WL, Olawale JT, Sekhohola-Dlamini LM, Cowan AK. Coal-degrading bacteria display characteristics typical of plant growth promoting rhizobacteria. *Processes.* 2020; 8(9):1111. doi: 10.3390/pr8091111
20. Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1999; 46(4): P. 327–338.
21. Wang H, Hou H, Huang J. *Citrobacter arsenatis* sp. nov., an arsenate-reducing bacterium isolated from freshwater sediment. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2021;114(8): 1285–1292. doi:10.1007/s10482-021-01601-y
22. Wang X, Huang N, Shao J, Hu M, Zhao Y, Huo M. Coupling heavy metal resistance and oxygen flexibility for bioremoval of copper ions by newly isolated *Citrobacter freundii* JPG1. *J. Environ. Manage.* 2018; 226:194–200. doi: 10.1016/j.jenvman. 2018.08.042
23. Zhang H, Li M, Yang Z, Sun Y, Yan J, Chen D, Chen Y. Isolation of a non-traditional sulfate reducing-bacteria *Citrobacter freundii* sp. and bioremoval of thallium and sulfate. *Ecol. Eng.* 2017; 102: 397–403. doi: 10.1016/j.ecoeng.2017.02.049

Стаття надійшла до редакції 15.08.2022 р.



УДК579.26:551.352:579.22:579.64

**М.Д. Штеніков, О.Ю. Зінченко, В.В. Болдирєва**  
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: shtenikovn@onu.edu.ua

## **АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ МОРСЬКИХ БАКТЕРІЙ РОДІВ *BACILLUS*, *PRIESTIA* І *RAENIBACILLUS* РІЗНИХ ТЕРМОТИПІВ**

**Мета.** Дослідити антагоністичну активність бактерій родів *Bacillus*, *Priestia* і *Raenibacillus* за різних умов культивування. **Методи.** В роботі досліджували 25 штамів антагоністично активних споротвірних бактерій, ізольованих з глибоководних донних відкладень Чорного моря. Визначення термотипів проводилося за результатами аналізу параметрів жирнокислотного профілю. Антагоністична активність по відношенню до тест-штамів умовно-патогенних бактерій виявлялася за методом агарових блоків на середовищах Гаузе № 1 та МПА за різних температур культивування. **Результати.** Аеробні бактерії родів *Bacillus*, *Priestia* та *Raenibacillus* всіх трьох термотипів – термотолерантні, мезофільні та психротрофні, в цілому демонструють нижчу антагоністичну активність за культивування при 37 °С, ніж за культивування при 30 °С на обох середовищах, за винятком помітної більш високої активності психротрофів при 37 °С на середовищі Гаузе № 1. **Висновки.** Встановлено, що приналежність до певного термотипу впливає на характер антагоністичної активності споротвірних бактерій. Антагоністична активність мезофільних та термотолерантних бактерій за більш високої температури культивування нижча, а у психротрофних бактерій за умов культивування при більш високій температурі на середовищі Гаузе № 1 вища.

*Ключові слова:* *Bacillus*, *Raenibacillus*, антагоністична активність, морські бактерії, термотипи

У часи поступового, але невпинного, розповсюдження антибіотикорезистентних патогенних мікроорганізмів, як ніколи раніше постає проблема вивчення мікроорганізмів – продуцентів антимікробних сполук [14]. У випадку маловивчених та потенційних продуцентів головними питаннями є ті, що стосуються ідентифікації нових сполук. При вивченні вже відомих пар «організм-сполука(-и)» актуальним є питання про можливе розширення спектру метаболітів, які можна отримати від даного організму, та отримання відомих і потрібних промисловості метаболітів у максимальних кількостях. Обидва питання стосуються механізмів регуляції вторинного метаболізму – відносно маловивченого навіть для модельних організмів аспекту їх біології [16].

Однією з методологічних проблем, що постає перед дослідниками при спробах вирішення даної проблеми є те, що саме цікаві для дослідження вторинного метаболізму організми мають дуже складні метаболітні спектри, кож-

© М.Д. Штеніков, О.Ю. Зінченко, В.В. Болдирєва, 2022



на підгрупа метаболітів в яких має власну систему регуляції. В тому числі і через це вичерпне вивчення метаболічної регуляції для кожного окремого виду потребує великих затрат ресурсів. Як яскравий приклад можна привести стан вивчення синтезу відомої «тріади» ліпопептидів бацил – сурфактину, ітурину та фенгіцину [16].

Втім, можна обґрунтовано припустити, що отримання нових метаболітів в промислових кількостях потребує не стільки тонкого молекулярно-біологічного аналізу, скільки урахування особливостей екофізіології окремих груп – оскільки антимікробні сполуки є лише одним з елементів арсеналу інструментів боротьби за існування. Така група організмів, як аеробні спороутвірні бактерії, є цікавим об'єктом для такого роду дослідження через відносну вивченість їх широкого антимікробного спектру, високий потенціал сполук, які відомі для них, та складність клітинної біології, що включає навіть диференціацію клітин у біоплівці [7, 17].

Дослідження антагоністичної активності аеробних споротвірних бактерій залежно від умов культивування проводяться і показують різні, і такі, що важко співставити, результати: так, відомий випадок зниження антифунгальної активності *B. subtilis* за неоптимальної температури культивування в трьох штамів з різними оптимумами росту [5], а в роботі Šimunović [13] найвищу антагоністичну активність проти *Campylobacter jejuni* *B. subtilis* показав за температури 42 °С. На жаль, не вдалося встановити оптимальну температуру для штаму *B. subtilis*, використаного в статті [13], але виходячи з того, що його добову культуру автори вирощували при 37 °С, а за літературними даними [7] оптимальна температура росту штамів даного виду знаходиться в діапазоні 28–30 °С, можна припустити, що для даного штаму температура 42 °С є неоптимальною. Дослідження антагоністичної активності, що були б сфокусовані на особливостях реакції на умови культивування представників різних термотипів, авторам не вдалося знайти.

Метою роботи було дослідити антагоністичну активність бактерій родів *Bacillus*, *Priestia* і *Paenibacillus* за різних умов культивування у зв'язку з їх екофізіологічними властивостями.

### Матеріали та методи

В роботі досліджували 25 штамів аеробних споротвірних бактерій родів *Bacillus*, *Priestia* та *Paenibacillus*, отриманих з глибоководних донних відкладень Чорного моря, які зберігаються в Колекції морських і практично корисних мікроорганізмів Одеського національного університету у вигляді клітинних суспензій за -84 °С. Виділення штамів даного музею проводили шляхом культивування розсіяних на агаризоване живильне середовище пастеризованих суспензій донних відкладень при 25 °С [2].

Тест-штами отримані з музею культур мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України; зберігання тест-штамів здійснювали на скошеному середовищі МПА при +4 °С.

Ідентифікацію штамів аеробних споротвірних бактерій проводили за допомогою визначення загального жирнокислотного складу ліпідів методом газової хроматографії з використанням пакету програмного забезпечення для





автоматичної ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI Inc, США).

Інтерпретацію даних, отриманих за допомогою MIDI Sherlock, виконували за значенням найвищого sim-індексу з запропонованих системою для кожного штаму, за виключенням випадків, коли sim-індекс був занадто низьким (<0,300); в такому випадку вважалося, що видуవు принадлежність штаму не визначено [11].

Для визначення відношення до температури (термотипу) використовували значення Heat Adaptation Index (HAI) та відношення часток антеізо- та ізо С15 ненасичених жирних кислот (a15/i15). HAI визначали за формулою [4]:

$$\text{HAI} = \frac{p(n14:0) + p(n16:0) + p(i14:0) + p(i15:0) + p(i16:0) + p(i17:0)}{p(a15:0) + p(a17:0) + p(n16:1) + p(i17:1(n-10)) + p(16:1\omega7\text{alcohol})}$$

Де р є часткою певної жирної кислоти.

Антагоністичну активність у виділених штамів визначали на щільних середовищах Гаузе № 1 та МПА (Himedia). Як тест-штами було обрано *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та *Escherichia coli* ATCC 25922. Досліджувані штами бацил засівали у двох повторах газом на поверхню МПА та середовища Гаузе № 1. По одному варіанту кожного штаму на обох середовищах інкубували при 30 °С і 37 °С протягом 48 год. Антагоністичну активність досліджуваних бактерій роду щодо *S. aureus* та *E. coli* перевіряли методом агарових блоків [1]; культури тест-штамів вирощували на МПА при 37 °С протягом 24 годин. За міру рівня використовувалися різниці діаметрів зон затримки росту та відповідних агарових блоків.

Визначення відношення C/N для середовища Гаузе № 1 проводилося шляхом обрахунку молярних відношень Карбону і Нітрогену в складі середовища (агар-агар в розрахунок не приймався). Для оцінки відношення C/N в МПА, за відсутності досяжної інформації по білках тваринного походження, довелося звертатися до роботи, де було оцінено елементні співвідношення у вірусних білках [6].

Статистичне опрацювання отриманих результатів здійснювали за допомогою стандартних статистичних методів, визначаючи середнє арифметичне отриманих значень та середнє квадратичне відхилення, а візуалізацію – за допомогою програмного пакету Excel.

### Результати дослідження та їх обговорення

Дані аналізу жирнокислотних профілів, результати якого включають видуву ідентифікацію досліджених штамів за допомогою системи MIDI Sherlock та розраховані для них індекси HAI та a15/i15, наведено на таблицях 1 і 2. З 25 штамів 19 ідентифіковано як види роду *Bacillus*, 5 як *Priestia* та один як *Paenibacillus* [2].

Профіль жирних кислот, що входять до складу мембранних ліпідів, є одним з засобів адаптації бактерій до змін навколишнього середовища і в першу чергу – до змін температури, відповідно до яких змінюється плинність цитоплазматичної мембрани. Індекси HAI та a15/i15 засновані на обчисленні співвідношення між частками типів жирних кислот, які протилежним чином впливають на залежність плинності мембран від температури. Значення HAI





Таблиця 1  
Table 1Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів психротрофних бактерій родів *Vacillus* та *Paenibacillus*  
Whole cell fatty acid lipid composition of psychrotrophic bacteria of genera *Vacillus* and *Paenibacillus*

Штам	Жирна кислота													HAI	AI5/i15
	n14:0	n16:0	i14:0	i15:0	i16:0	i17:0	a15:0	a17:0	n16:1 ω11c	i17:1 ω10c	16:1ω7 calcohol				
<i>Bacillus subtilis</i> 212	1,47	2,33	5,37	24,98	2,06	0,87	56,43	1,69	1,81	0,32	1,14	0,604	2,259		
<i>B. subtilis</i> 231	0,00	7,45	0,84	16,10	2,93	11,61	39,90	15,34	1,90	1,64	0,00	0,662	2,478		
<i>B. subtilis</i> B	0,60	5,65	0,87	19,19	2,62	10,69	41,91	12,84	1,69	1,60	0,45	0,677	2,184		
<i>Paenibacillus larvae</i> 018	0,84	8,15	0,91	20,30	2,81	8,73	43,35	11,42	1,07	0,69	0,00	0,738	2,136		
<i>B. atrophacus</i> 200	0,33	2,84	1,13	24,50	3,30	6,38	46,93	11,12	0,81	0,52	0,30	0,645	1,916		
<i>B. subtilis</i> 217	0,00	2,05	1,03	24,55	3,82	7,82	44,40	12,26	0,75	1,17	0,38	0,666	1,809		
<i>B. subtilis</i> 203	0,21	1,76	1,19	25,34	3,61	8,91	45,06	10,24	0,50	1,24	0,40	0,714	1,778		
<i>B. subtilis</i> 204	0,00	1,92	1,23	25,13	3,97	8,65	43,26	11,82	0,58	1,55	0,00	0,715	1,721		
<i>B. subtilis</i> 053	0,30	2,08	1,42	26,80	3,56	7,21	45,27	9,23	0,85	1,19	0,48	0,726	1,689		
<i>B. subtilis</i> 1	0,00	2,06	1,21	25,86	3,29	8,84	42,37	10,07	1,15	2,41	0,82	0,726	1,638		
<i>B. subtilis</i> 1223	0,00	1,64	1,24	27,72	3,46	6,88	43,53	9,31	0,60	1,25	0,51	0,742	1,570		
<i>B. subtilis</i> 021	0,66	6,39	1,00	23,38	2,79	8,74	43,94	9,75	1,03	0,85	0,00	0,773	1,879		
<i>B. subtilis</i> 013	0,00	2,20	1,14	28,93	3,47	9,72	40,03	10,26	0,87	1,56	0,47	0,855	1,384		



Таблиця 2  
Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів мезофільних та термотолерантних бактерій родів *Bacillus* та *Priestia*  
Table 2

Whole cell lipid composition of mesophilic and thermotolerant bacteria of genera *Bacillus* and *Priestia*

Штам	Жирна кислота													HAI	AI5/i15	
	n14:0	n16:0	i14:0	i15:0	i16:0	i17:0	a15:0	a17:0	n16:1 ω11c	i17:1 ω10c	16:1 ω7 calcohol					
Мезофільні	<i>Bacillus subtilis</i> 219	0,22	1,63	1,05	32,54	2,33	10,01	39,54	7,21	0,77	2,10	0,52			<b>0,953</b>	<b>1,215</b>
	<i>B. pumilus</i> 229	0,37	1,59	0,61	38,93	2,29	5,36	40,44	8,44	0,18	0,36	0,18			<b>0,991</b>	<b>1,039</b>
	<i>Priestia megaterium</i> 036	0,49	1,71	0,75	39,61	2,34	4,40	42,08	6,77	0,15	0,25	0,14			<b>0,998</b>	<b>1,062</b>
	<i>B. subtilis</i> 247	0,70	5,00	1,28	29,80	3,03	9,60	38,77	8,05	1,27	1,21	0,00			<b>1,002</b>	<b>1,301</b>
	<i>B. pumilus</i> 049	0,38	1,58	0,76	39,42	2,81	5,04	40,14	7,83	0,21	0,38	0,20			<b>1,025</b>	<b>1,018</b>
Термотолерантні	<i>P. megaterium</i> 054	0,00	1,74	0,47	41,32	2,06	5,33	39,50	8,31	0,00	0,00	0,00			<b>1,065</b>	<b>0,956</b>
	<i>B. pumilus</i> A	0,43	1,63	0,80	40,25	2,80	5,25	39,55	7,46	0,23	0,38	0,21			<b>1,070</b>	<b>0,983</b>
	<i>B. pumilus</i> 041	0,39	1,77	0,62	40,60	2,66	5,95	37,95	8,58	0,00	0,30	0,00			<b>1,110</b>	<b>0,935</b>
	<i>P. megaterium</i> 63	0,34	1,70	0,60	42,38	2,58	5,01	38,34	7,75	0,00	0,27	0,00			<b>1,135</b>	<b>0,905</b>
	<i>B. licheniformis</i> 048	0,33	2,08	0,54	42,51	2,38	6,00	36,32	8,47	0,00	0,44	0,00			<b>1,190</b>	<b>0,854</b>
	<i>P. megaterium</i> 051	0,31	1,59	0,44	45,66	1,70	5,57	35,53	7,17	0,00	0,52	0,00			<b>1,279</b>	<b>0,778</b>
	<i>P. megaterium</i> 055	0,33	1,20	0,63	51,86	1,80	3,60	33,47	4,64	0,29	0,58	0,24			<b>1,515</b>	<b>0,645</b>



близьке до одиниці властиве мезофільним штамам, більше за одиницю – термофільним та менше за одиницю, відповідно, психрофільним. Відповідно, мезофільні штами демонструють значення відношення  $a_{15}/i_{15}$  між 1 та 3; значення цього показника, що перевищують 3, властиві психрофільним штамам (оскільки надлишок антеізо-С15 жирної кислоти надає мембрані плинності за нижчих температур [4]), а менші за одиницю – термофільним штамам.

Як мезофіли в роботі було інтерпретовано штами зі значеннями  $NAI$   $1 \pm 0,1$  [4]. Показник  $a_{15}/i_{15}$ , хоча і пов'язаний з  $NAI$ , не дає змоги так само чітко розділити досліджувані штами на групи, оскільки в жодному випадку не приймає значень, щоб дорівнювали 3 або перевищували це число. Проте його використання підтверджує релевантність виділення за показником  $NAI$  групи термотолерантних штамів у повному її складі (всі штами,  $NAI$  яких перевищує 1,1, також мають  $a_{15}/i_{15} < 1$ ) та дає засади умовно поділити численну групу психротрофних штамів на психротрофних та «глибоко психротрофних», серед яких останні відрізняються за значенням  $a_{15}/i_{15}$  вищим за 2.

З 25 досліджених штамів до термотолерантного термотипу було віднесено 5 штамів, до мезофільного – 7, решта виявилися психротрофами. «Глибоко психротрофними» вважали 4 штами, а саме: 212, 231, В та 018. Велика частка психротрофних штамів не узгоджується із висловленою нами раніше гіпотезою про алохтонність аеробних спорогенів для донних відкладень сірководневої зони Чорного моря, але може бути артефактом, оскільки штами для даного дослідження було відібрано за наявністю високої антимікробної активності з колекції зі 148 штамів [3, 12].

Результати скринінгу на наявність антагоністичної активності у досліджуваних штамів представлено на графіках (рис. 1–6) та таблицях (табл. 3, 4). На графіках представлено лише дані для штамів, що демонстрували за принаймні однієї температури культивування антагоністичну активність, яка реєструється, та її значення було статистично достовірно відмінним за різних температур культивування.

З групи термотолерантних штамів всі досліджені штами показали антагоністичну активність по відношенню до *S. aureus*, і лише 3 – до *E. coli*. Слід відзначити, що за культивування на МПА, антагоністична активність до *E. coli* у всіх термотолерантних штамів взагалі була відсутня.

За вищої температури культивування на середовищі Гаузе № 1 антагоністична активність всіх досліджуваних штамів до *S. aureus* була меншою. А у двох штамів з трьох активних проти *E. coli* за тих самих умов – вищою, ніж за культивування при 30 °С (рис. 1).

Результати того ж дослідження на більш багатому середовищі МПА виявилися менш показовими – як зазначалося раніше, жоден термотолерантний штам не продемонстрував антагоністичну активність проти *E. coli*. По відношенню до *S. aureus* лише три з п'яти штамів показали більш низьку антагоністичну активність і один (048) навіть демонстрував більш високу антагоністичну активність за 37 °С, ніж за 30 °С (рис. 2). Рівень антагоністичної активності штаму 041 значущих відмінностей за різних температур культивування не продемонстрував.



Таблиця 3

Антагоністична активність психротрофних штамів по відношенню до *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*

Table 3

Antagonistic activity of psychrotrophic strains against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Штам	Середовище Гаузе №1		Середовище МПА		
	30 °С	37 °С	30 °С	37 °С	
Тест-штам: <i>S. aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 212	22±0,0	23±0,0	14,5±0,5	14,5±0,5
	<i>B. subtilis</i> 231	21±1,0	20±1,0	19±1,0	14,5±1,0
	<i>B. subtilis</i> B	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Paenibacillus larvae</i> 018	20±0,0	20±0,0	18±0,0	12±0,0
	<i>B. atrophaeus</i> 200	17,5±2,5	22±0,0	20±0,0	11,5±0,5
	<i>B. subtilis</i> 217	19±1,0	15,5±1,0	22±0,0	9±0,0
	<i>B. subtilis</i> 203	16±4,0	18±1,0	14±0,0	8,5±0,5
	<i>B. subtilis</i> 204	18±0,0	16,5±1,5	15±0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 053	20±0,0	20±0,0	10,5±1,5	17±1,5
	<i>B. subtilis</i> 1	18±0,0	21,5±0,0	12±1,0	10±1,0
	<i>B. subtilis</i> 1223	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 021	20±0,0	21±0,0	16±0,0	10±0,0
	<i>B. subtilis</i> 013	19±1,0	21,5±0,5	14,5±0,5	10,5±0,5
Тест-штам: <i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i> 212	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 231	4±0,5	7±0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> B	12±0,0	12,5±0,5	7±0,0	7±0,0
	<i>P. larvae</i> 018	13,5±0,5	13±1,0	13±1,0	9±0,0
	<i>B. atrophaeus</i> 200	10,5±0,5	13±0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 217	0,0	10±1,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 203	10,5±0,5	11±1,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 204	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 053	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 1	13,5±0,5	15±0,0	9±0,0	9±0,0
	<i>B. subtilis</i> 1223	8±1,0	11±0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 021	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 013	13±1,0	12±0,0	9±0,0	0,0

Примітка: Результати наведено в міліметрах. Після ± наведено середнє квадратичне відхилення.

Note: Result are given in millimeters. After ± are given standart deviations.



Таблиця 4

Антагоністична активність мезофільних та термотолерантних штамів  
по відношенню до *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*

Table 4

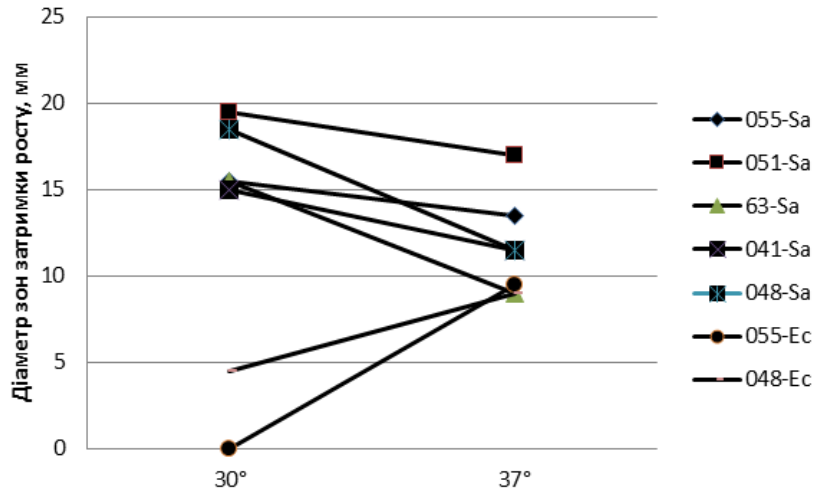
Antagonistic activity of mesophilic and thermotolerant strains against  
*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Штам		Середовище Гаузе №1		Середовище МПА		
		30 °C	37 °C	30 °C	37 °C	
Мезофільні	Тест-штам: <i>S. aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 219	17±0,0	16±2,0	12±0,0	11±2,0
		<i>B. pumilus</i> 229	12,5±0,5	0,0	14,5±0,5	0,0
		<i>Priestia megaterium</i> 036	20±0,0	20±0,0	20±0,0	12±0,0
		<i>B. subtilis</i> 247	17±1,0	16,5±0,5	12±0,0	8,5±0,5
		<i>B. pumilus</i> 049	19±1,0	11±1,0	20±0,0	10,5±0,5
		<i>P. megaterium</i> 054	20,5±0,5	15±1,0	18±0,0	11,5±0,5
		<i>B. pumilus</i> A	21,5±1,5	15±0,0	21±1,0	14±0,0
	Тест-штам: <i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i> 219	10,5±0,5	10,5±0,5	0,0	0,0
		<i>B. pumilus</i> 229	13,5±0,5	10,5±0,5	12,5±0,5	7±0,0
		<i>P. megaterium</i> 036	11,5±0,5	12,5±1,5	11,5±0,5	12±0,0
		<i>B. subtilis</i> 247	11,5±0,5	9,5±1,5	0,0	7±0,0
		<i>B. pumilus</i> 049	8±0,0	9±1,0	0,0	0,0
		<i>P. megaterium</i> 054	0,0	0,0	12±1,0	0,0
		<i>B. pumilus</i> A	0,0	0,0	0,0	0,0
Термотолерантні	Тест-штам: <i>S. aureus</i>	<i>Priestia megaterium</i> 055	15,5±0,5	13,5±0,5	15,5±0,5	10,5±0,5
		<i>P. megaterium</i> 051	19,5±0,5	17±1,0	16±0,0	11,5±0,5
		<i>P. megaterium</i> 63	15,5±0,5	9±0,0	14,5±0,5	10±1,0
		<i>B. pumilus</i> 041	15±0,0	11,5±0,5	15,5±4,5	16,5±0,5
		<i>B. licheniformis</i> 048	18,5±0,5	11,5±0,5	10±0,0	14±3,0
	Тест-штам: <i>E. coli</i>	<i>B. pumilus</i> 041	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>P. megaterium</i> 63	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>B. licheniformis</i> 048	4,5±0,5	9±0,0	0,0	0,0
		<i>P. megaterium</i> 051	11,5±0,0	11,5±0,0	0,0	0,0
		<i>P. megaterium</i> 055	0,0	9,5±0,5	0,0	0,0

Примітка: Результати наведено в міліметрах. Після ± наведено середнє квадратичне відхилення.

Note: Result are given in millimeters. After ± are given standart deviations.



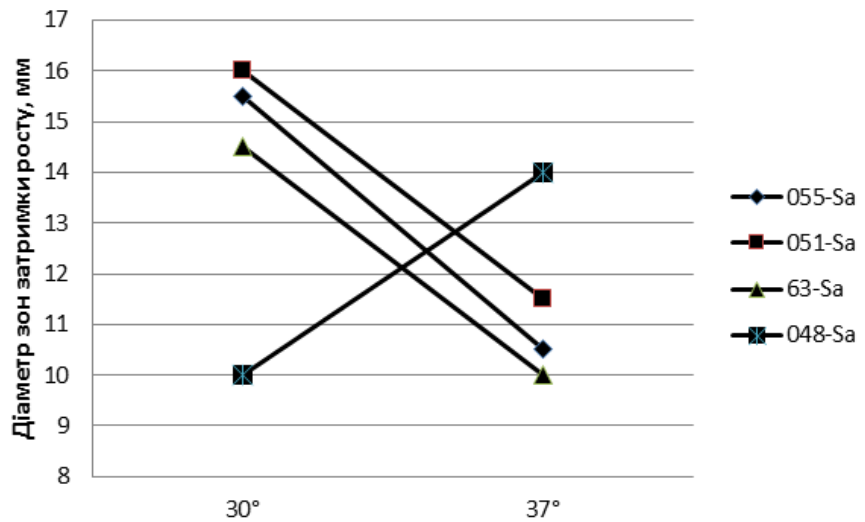


**Рис. 1. Антагоністична активність бактерій термотолерантних штамів на середовищі Гаузе № 1 за температур 30 °С і 37 °С**

Примітка: Колонка справа – номери штамів, Sa – антагоністична активність проти *Staphylococcus aureus*, Ec – активність проти *Escherichia coli*

**Fig. 1. Antagonistic activity of bacteria of thermotolerant strains on Gauze № 1 medium at temperatures 30 °C і 37 °C**

Note: Right column – strain numbers, Sa – antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, Ec – activity against *Escherichia coli*



**Рис. 2. Антагоністична активність бактерій термотолерантних штамів на середовищі МПА за температур 30 °С і 37 °С**

Примітка: Колонка справа – номери штамів, Sa – антагоністична активність проти *Staphylococcus aureus*

**Fig. 2. Antagonistic activity of bacteria of thermotolerant strains on Nutrient agar medium at temperatures 30 °C і 37 °C**

Note: Right column – strain numbers, Sa – antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*





Антагоністична активність серед мезофільних штамів навіть більш виражена. Всі досліджені штами демонструють антагоністичну активність по відношенню до *S. aureus* хоча б за одного режиму культивування. По відношенню до *E. coli* неактивним за всіх дослідних умов виявився лише один штам – А (рис. 3, 4).

Антагоністична активність по відношенню до *S. aureus* добре виражена на обох середовищах, що були використані в роботі. За вищої температури культивування на середовищі Гаузе № 1 вона була достовірно відмінною лише в 4 з 7 штамів і при тому меншою (рис. 3). Штам 229 повністю втрачає антагоністичну активність по відношенню до *S. aureus* при температурі 37 °С як на Гаузе № 1, так і на МПА (рис. 3, 4). Цей самий штам є єдиним, який за тих самих умов дещо змінює антагоністичну активність на Гаузе № 1 до *E. coli* – також у бік зменшення.

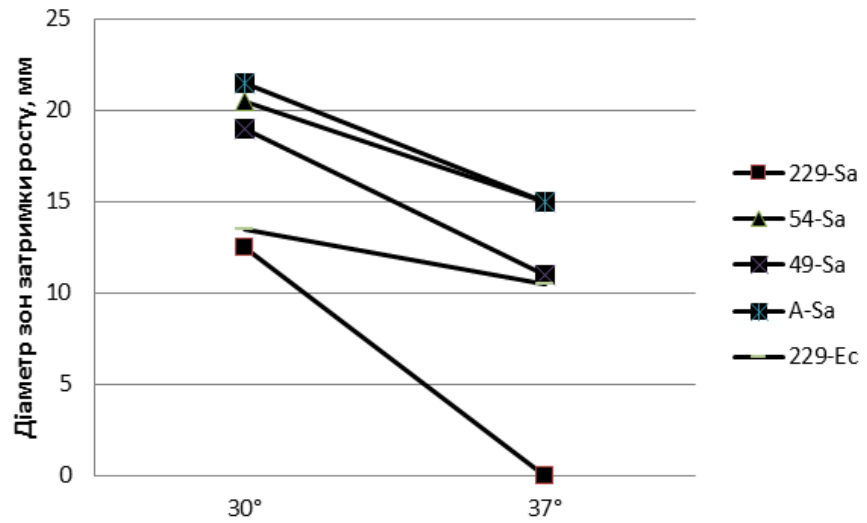
Антагоністична активність мезофільних штамів до *E. coli* при 37 °С у порівнянні з такою за 30 °С знижується тільки у штаму 229 на Гаузе № 1 (рис. 3), та двох (229 і 54) на МПА. Лише в штаму 247 ця зміна є позитивною (на МПА, рис. 4).

Залежність антагоністичної активності психротрофних штамів від умов культивування виявилася певною мірою неочікуваною. З 13 досліджених психротрофних штамів за культивування на Гаузе № 1 антагоністичну активність до хоча б одного з індикаторних штамів проявили всі досліджені штами. Її значення при температурі 37 °С виявилось вищим за антагоністичну активність при 30 °С у 6 штамів до *S. aureus* та у чотирьох до *E. coli* (рис. 5). Відмітимо штам 217, який на Гаузе № 1 при 37 °С з неактивного до *E. coli* став активним.

Натомість картина, що спостерігається за культивування психротрофних тест-штамів на МПА, принципово схожа на таку, що спостерігалася для штамів більш термофільних термотипів. Для 10 з 11 штамів, для яких помітна умовна зміна антагоністичної активності з ростом температури, її характер негативний (рис. 6). Штами 204 та 013 навіть повністю втрачають антагоністичну активність при 37 °С.

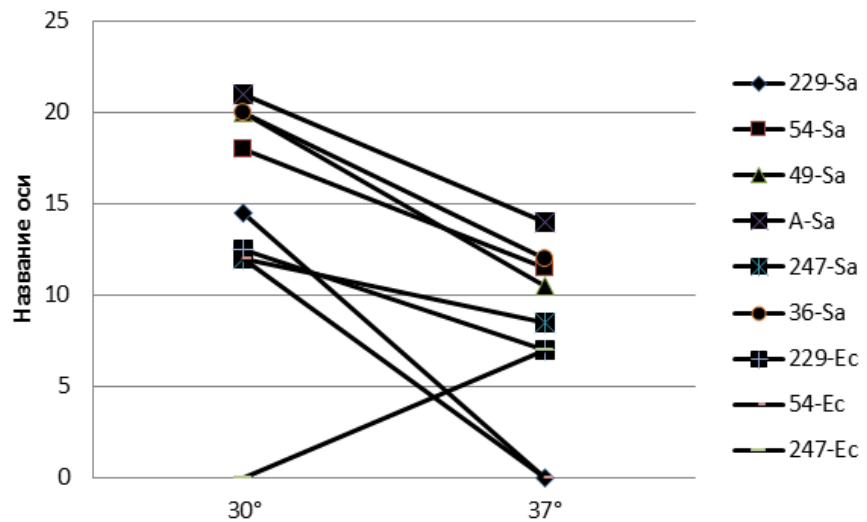
Характер зміни антагоністичної активності штамів, що було нами віднесено до категорії «глибоких психротрофів», тобто таких, що мають показники жирнокислотних профілів дуже близькі до таких у психрофілів, в цілому вписується в тенденцію, яку демонструє більшість досліджених нами психротрофних штамів у відповідних умовах. Так, на середовищі Гаузе № 1 штами 212 та 231 демонструють підвищення антагоністичної активності з ростом температури, а на МПА штами 231 та 018 – її зниження.

Залежність характеру антагоністичної активності від термотипу в даному дослідженні виявилася залежною також від складу середовища. Це особливо цікаво у випадку двох досить різних за складом середовищ, як Гаузе № 1 та МПА, які було використано в даній роботі. Серед відмінностей цих середовищ найбільш глобальною можна назвати їх відмінність по молярному відношенню C/N, яке для Гаузе № 1 сягає приблизно 66, а для МПА, за непрямою оцінкою [6], може бути в межах 2,9–3,4.



**Рис. 3. Антагоністична активність бактерій мезофільних штамів на середовищі Гаузе № 1 за температур 30 °С і 37 °С**  
 Примітка: Колонка справа – номери штамів, Sa – антагоністична активність проти *Staphylococcus aureus*, Ec – активність проти *Escherichia coli*

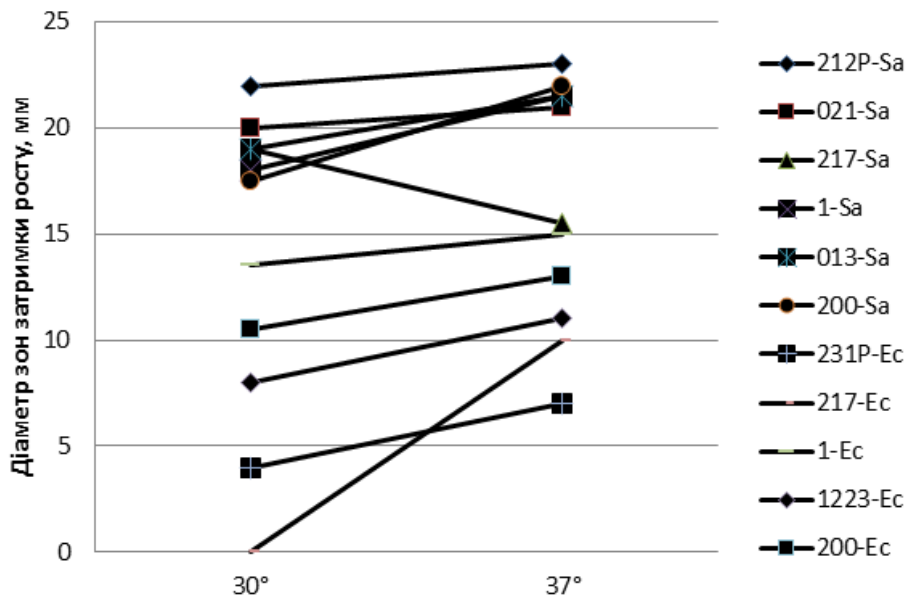
**Fig. 3. Antagonistic activity of bacteria of mesophilic strains on Gauze № 1 medium at temperatures 30 °C i 37 °C**  
 Note: Right column – strain numbers, Sa – antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, Ec – activity against *Escherichia coli*



**Рис. 4. Антагоністична активність бактерій мезофільних штамів на середовищі МПА за температур 30 °С і 37 °С**  
 Примітка: Колонка справа – номери штамів, Sa – антагоністична активність проти *Staphylococcus aureus*, Ec – активність проти *Escherichia coli*

**Fig. 4. Antagonistic activity of bacteria of mesophilic strains on Nutrient Agar medium at temperatures 30 °C i 37 °C**  
 Note: Right column – strain numbers, Sa – antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, Ec – activity against *Escherichia coli*





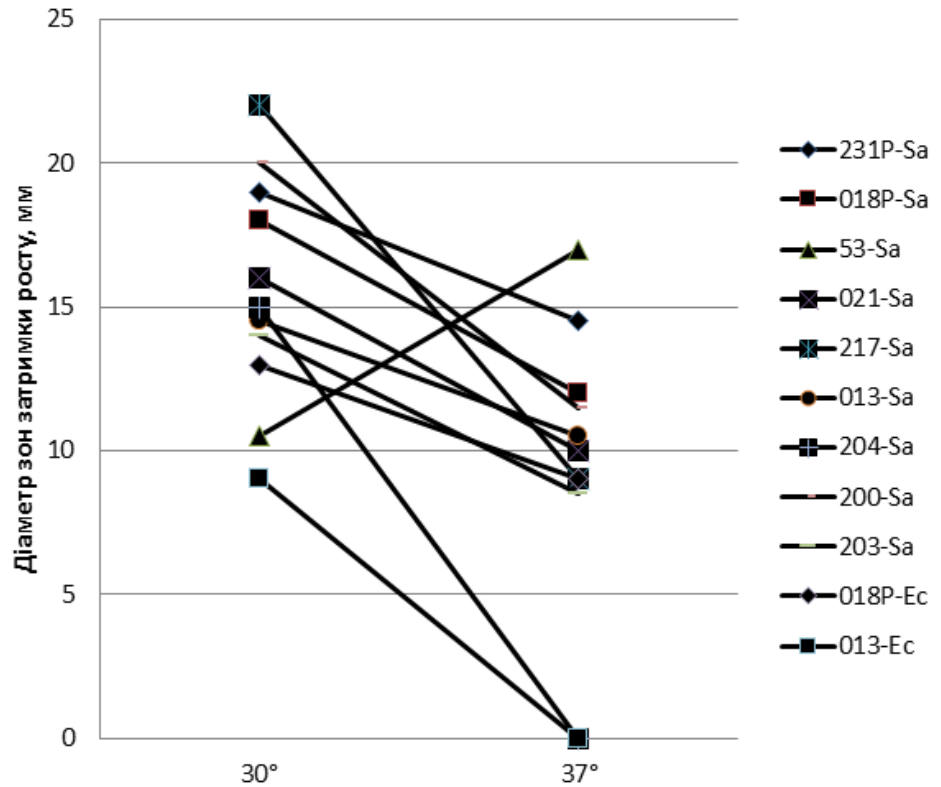
**Рис. 5. Антагоністична активність бактерій психротрофних штамів на середовищі Гаузе № 1 за температур 30 °C і 37 °C**

Примітка: Колонка справа – номери штамів, Sa – антагоністична активність проти *Staphylococcus aureus*, Ec – активність проти *Escherichia coli*. P після номеру штаму – «глибокий психротроф»

**Fig. 5. Antagonistic activity of bacteria of psychrotrophic strains on Gauze № 1 medium at temperatures 30 °C і 37 °C**

Note: Right column – strain numbers, Sa – antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, Ec – activity against *Escherichia coli*. P after a strain number – “deep psychrotrophe”

З екофізіологічної точки зору спостережений результат можна пояснити тим, що для термотолерантних і мезофільних бактерій температура, що дорівнює 37 °C, не є значним виходом за межі температурного оптимуму. Тут варто пригадати, що психротрофи даної колекції є мезотолерантними, оскільки їх виділення проводилося за температури 25 °C в рамках іншої роботи. І лише на бідному на чинники росту, проте з високим відношенням C/N середовищі, умови за культивування при 37 °C виявляються досить екстремальними для даних організмів, аби це призвело до активації додаткових механізмів конкуренції за типом секреції антибактеріальних сполук. Вираженість даного ефекту саме на середовищі Гаузе № 1 може свідчити про участь у ньому сполук класу полікетидів, синтез яких не потребує високої кількості Нітрогену у середовищі [8]; також відомий випадок одночасної продукції сурфактину, ліхеніну, ітуруну та ряду фенгіцинів за культивування на синтетичному середовищі з 20% глюкози та сумарно 4% нітрогенвмісних сполук [10]. Аналогічним чином можна пояснити антагоністичну активність до широкого спектру бактерій ізоляту *Bacillus subtilis* MIR 15 з аргентинського ґрунту, яку він демонстрував за температури культивування 37 °C, попри типовий оптимум для представників даного виду [7, 9].



**Рис. 6. Антагоністичну активність бактерій психротрофних штамів на середовищі МПА за температур 30 °С і 37 °С**

Примітка: Колонка справа – номери штамів, Sa – антагоністична активність проти *Staphylococcus aureus*, Ec – активність проти *Escherichia coli*

**Fig. 6. Antagonistic activity of bacteria of psychrotrophic strains on Nutrient Agar medium at temperatures 30 °C і 37 °C**

Note: Right column – strain numbers, Sa – antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, Ec – activity against *Escherichia coli*

Встановлено, що належність до певного термотипу впливає на характер антагоністичної активності споротвірних бактерій. Термотолерантні та мезофільні бактерії демонструють більш низьку антагоністичну активність на різних середовищах при температурі 37 °С, ніж за 30 °С. Антагоністична активність психротрофних бактерій за умов культивування при більш високій температурі та на середовищі Гаузе № 1 є вищою; можливо, це зумовлено поєднанням чинників неоптимальної температури для росту та високим відношенням C/N у середовищі, що може сприяти синтезу полікетидних антибіотиків.



M.D. Shtenikov, O.Y. Zinchenko, V.V. Boldyreva

Odesa Mechnykov National University  
Dvorianska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: shtenikovn@onu.edu.ua

## ANTAGONISTIC ACTIVITY OF MARINE BACTERIA OF *BACILLUS*, *PRIESTIA* AND *PAENIBACILLUS* GENERA OF DIFFERENT THERMOTYPES

### Summary

**Aim.** To study the antagonistic activity of bacteria of genera *Bacillus*, *Priestia* and *Paenibacillus* at different conditions of cultivation. **Methods.** Antagonistically active spore-forming bacteria isolated from deep-sea bottom sediments of the Black Sea were used for the study. Determination of thermotypes was performed using the results of analysis of fatty acid profile parameters. Antagonistic activity to test strains of bacterial opportunistic pathogens was detected by the method of agar blocks on Gauze № 1 and Nutrient Agar media at different cultivation temperatures. **Results.** Aerobic bacilli of genera *Bacillus*, *Priestia* and *Paenibacillus* of all three thermotypes – thermotolerants, mesophiles and psychrotrophes, in general show lower antagonistic activity when cultured at 37 °C on both media, except for a marked increase in psychrotrophe antagonistic activity at 37 °C on Gauze № 1. **Conclusions.** It was established that belonging to a certain thermotype affects the character of the antagonistic activity of sporeforming bacteria. The antagonistic activity of mesophilic and thermotolerant bacteria at a higher temperature of cultivation is lower, and that of psychrotrophic bacteria at a higher temperature and on Gauze № 1 medium is higher.

**Key words:** *Bacillus*, *Paenibacillus*, antagonistic activity, marine bacteria, thermotypes

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білай В.І. Методи експериментальної мікології. – Київ: Наукова думка, 1982. – С. 272.
2. Іваниця В.О., Штеніков М.Д., Остапчук А.М. Факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії глибоководних відкладень чорного моря // *Microbiology & Biotechnology*. – 2017. – Vol. 40, № 4. – P. 94–103.
3. Штеніков М.Д. Аеробні споротвірні бактерії глибоководних осадов Чорного моря: Автореф. дис. на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. Одеса, 2020. – 26 с.
4. Diomandé S.E., Nguyen-The C., Guinebretière M.H., Broussolle V., Brillard J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – С. 1–20.
5. Jiménez-Delgado R., Valdés-Rodríguez S.E., Olalde-Portugal V., Abraham-Juárez R., García-Hernández J. L. Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani* // *Revista mexicana de fitopatología*. – 2018. – Vol. 36, № 2. – P. 256–275.
6. Jover L.F., Effler T.C., Buchan A., Wilhelm S.W., Weitz J.S. The elemental composition of virus particles: implications for marine biogeochemical cycles // *Nature Reviews Microbiology*. – 2014. – Vol. 12, № 7. – P. 519–528.



7. Logan N.A, De Vos P. *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Ed Whitman WB. – John Wiley & Sons, Inc, 2015. – P. 1–163
8. Moreira J.V., Seforah C.M.S., Cremasco M.A. Evaluation of carbon: nitrogen ratio in semi-defined culture medium to tacrolimus biosynthesis by *Streptomyces tsukubaensis* and the effect on bacterial growth // *Biotechnology Reports*. – 2020. – Vol. 26. – P: e00440.
9. Perez C., Suarez C., Castro G.R. Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15 // *Journal of biotechnology*. – 1992. – Vol. 26, № (2–3) . – P. 331–336.
10. Pueyo M.T., Bloch C., Carmona-Ribeiro A.M., Di Mascio P. Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain // *Microbial ecology*. – 2009. – Vol. 57, N2. – P. 367–378.
11. Sasser M. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids, Technical Note 101. – Newark, DE:MIDI, 1990. – P. 1–7.
12. Shtenikov M.D., Ostapchuk A.M., Ivanytsia V.O. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black Sea sediments // *Microbiology & Biotechnology*. – 2018. – Vol. 43, № 3. – P. 82–89.
13. Šimunović K., Stefanic P., Klančnik A., Erega A., Mandic Mulec I., Možina S.S. *Bacillus subtilis* PS-216 Antagonistic Activities against *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 Are Modulated by Temperature, Oxygen, and Growth Medium // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10, № 2. – P. 289.
14. Sulis G., Sayood S., Gandra S. Antimicrobial resistance in low-and middle-income countries: current status and future directions // *Expert review of anti-infective therapy*. – 2022. – Vol. 20, № 2. – P. 147–160.
15. Tyurin A.P., Efimenko T.A., Prokhorenko I.A., Rogozhin E.A., Malanicheva I.A., Zenkova V.A. Amicoumacins and Related Compounds: Chemistry and Biology // *Studies in Natural Products Chemistry*. – 2018. – Vol. 55. – P. 385–441.
16. Yang R., Lei S., Xu X., Jin H., Sun H. et al. Key elements and regulation strategies of NRPSs for biosynthesis of lipopeptides by *Bacillus* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 104, № 19. – P. 8077–8087.
17. Zhao X., Kuipers O.P. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species // *BMC Genomics*. – 2016. – Vol. 17, № 1. – P. 1–18.

## REFERENCES

1. Bilaj VI. Metody eksperimentalnoj mikologii [Methods of Experimental Mycology]. Kyiv: Naukova dumka, 1982:272 (in Russian)
2. Ivanytsia VO, Shtenikov MD, Ostapchuk AM. Facultatively-anaerobic endosporeforming bacteria of deep water bottom sediments of Black sea. *Microbiology & Biotechnology*. 2017;40(4):94–103. (in Ukrainian)
3. Shtenikov MD. Aerobic spore-forming bacteria of deep-water sediments of the Black Sea. Qualifying scientific work on the rights of the manuscript. Odesa, 2020:26 (in Ukrainian)





4. Diomandé SE, Nguyen-The C, Guinebretière MH, Broussolle V, Brillard J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Front. Microbiol.* 2015;(6):1–20.
5. Jiménez-Delgadillo R, Valdés-Rodríguez SE, Olalde-Portugal V, Abraham-Juárez R, García-Hernández JL. Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*. *Revista mexicana de fitopatología.* 2018;36(2):256–275.
6. Jover LF, Effler TC, Buchan A, Wilhelm SW, Weitz JS. The elemental composition of virus particles: implications for marine biogeochemical cycles. *Nature Reviews Microbiology.* 2014;12(7):519–528.
7. Logan N. A, De Vos P. *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* Ed Whitman WB. John Wiley & Sons, Inc, 2015:1–163
8. Moreira JV, Seforah CMS, Cremasco MA. Evaluation of carbon: nitrogen ratio in semi-defined culture medium to tacrolimus biosynthesis by *Streptomyces tsukubaensis* and the effect on bacterial growth. *Biotechnology Reports.* 2020;26:e00440.
9. Perez C, Suarez C, Castro GR. Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15. *Journal of biotechnology.* 1992;26(2-3):331–336.
10. Pueyo MT, Bloch C, Carmona-Ribeiro AM, Di Mascio P. Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. *Microbial ecology.* 2009;57(2):367–378.
11. Sasser M. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular FattyAcids, Technical Note 101. Newark, DE:MIDI; 1990:1–7.
12. Shtenikov MD, Ostapchuk AM, Ivanytsia VO. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black Sea sediments. *Microbiology & Biotechnology.* 2018;43(3):82–89.
13. Šimunović K, Stefanic P, Klančnik A, Erega A, Mandic Mulec I, Možina SS. *Bacillus subtilis* PS-216 Antagonistic Activities against *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 Are Modulated by Temperature, Oxygen, and Growth Medium. *Microorganisms.* 2022;10(2):289.
14. Sulis G, Sayood S, Gandra S. Antimicrobial resistance in low-and middle-income countries: current status and future directions. *Expert review of anti-infective therapy.* 2022;20(2):147–160.
15. Tyurin AP, Efimenko TA, Prokhorenko IA, Rogozhin EA, Malanicheva I A, Zenkova VA. Amicoumacins and Related Compounds: Chemistry and Biology // *Studies in Natural Products Chemistry.* Elsevier, 2018;55:385–441.
16. Yang R, Lei S, Xu X, Jin H, Sun H et al. Key elements and regulation strategies of NRPSs for biosynthesis of lipopeptides by *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2020;104(19):8077–8087.
17. Zhao X, Kuipers OP. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics.* 2016;17(1):1–18.

Стаття надійшла до редакції 31.07.2022 р.



## ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

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

**Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:**

Стаття має відповідати тематичному спрямуванню журналу і, відповідно до п. 3 Постанови ВАК України від 15.01.2003 р. №7-5/1, включати такі структурні елементи: постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано вирішення даної проблеми і на які опирається автор; виокремлення раніше не вирішених частин загальної проблеми, котрим присвячується стаття; формулювання мети статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням наукових результатів; висновки з даного дослідження і перспективи подальших пошуків у даному напрямі.

До друку приймаються рукописи (2 примірники) обсягом до 18 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди – до 30 стор., рецензії – до 3 стор., короткі повідомлення – до 2 стор. Відхилені рукописи не повертаються.

До рукопису додається електронний варіант рукопису шрифт Times New Roman, кегль 14, інтервал автоматичний, не більше 30 рядків на сторінці, поля по 2 см).

**При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:**

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;
- Реферат мовою оригіналу статті:
  - назва статті великими літерами;
  - прізвища та ініціали автора (авторів);
  - місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail);



- прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти).
- Реферат англійською мовою:
  - назва статті великими літерами;
  - прізвища та ініціали автора (авторів), транслітерація;
  - місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail);
  - прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
  - реферат із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
  - ключові слова (не більше п'яти);
- Повний текст статті мовою оригіналу.

**Текст статті має включати такі складові:**

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

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

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.



Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то абревіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Посилання на літературу подаються у тексті статті, цифрами у квадратних дужках, згідно з порядковим номером у списку літератури.

#### **Розділ «Матеріали і методи»:**

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

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

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

До рисунків мають бути підписи не згруповані з ним і не вставлені в об'єкт рисунка.

Позначення на рисунку мають бути інтегровані в нього, тобто копіюватися разом з рисунком, а не окремими частинами.

Всі ілюстрації мають бути розміщені в файлі рукопису, також обов'язково додані до електронного варіанту у вигляді файлів формату JPEG.

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

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



**Список використаної літератури**

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

У посиланні пишуть прізвища усіх авторів. В експериментальних працях має бути не більше 15 посилань літературних джерел.

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

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

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

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

Назви статей наводять англійською мовою.

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

**Зразки посилання літератури**

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

**На книги**

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

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

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

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

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

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

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

**На журнальні статті**

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

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





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

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

#### **На тези доповідей**

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

#### **На депоновані наукові роботи**

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

#### **На стандарти**

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

#### **На автореферати дисертацій**

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

#### **Зразки посилань літератури в романській абетці**

##### **References**

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

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

##### **Статті в журналах:**

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

Klochkov VK, Kavok NS, Malyukin YuV. The effect of specific interaction of nanocrystals GdYVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> with cell nuclei. Dop Nats Akad Nauk Ukr. 2010;(10):81–86.

##### **Книги:**

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

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

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

##### **Матеріали з'їздів, конференцій:**

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





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

*Верстка С. О. Остапенко*

Підписано до друку 12.09.2022 р. Формат 70x100/16.  
Ум.-друк. арк. 5,10. Тираж 50 пр.  
Зам. № 2479.

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