

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

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

№ 2(61)
2024

Одеса
ОНУ
2024

Засновник
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Ідентифікатор у Реєстрі суб'єктів у сфері медіа: R30-01955
(Рішення Національної ради України з питань телебачення і радіомовлення № 1548 від 23.11.2023 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. Патики (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 у таких базах даних: «Україніка наукова»,
Index Copernicus International Journals Master List, Наукова періодика України
(Національна бібліотека України імені В. І. Вернадського), Ulrich's Periodicals
Directory, Електронний архів-репозитарій Одеського національного університету
імені І. І. Мечникова, Наукова періодика України (journal.onu.edu.ua), Google
Академія, BASE Search, CiteFactor, Advanced Sciences Index, ResearchBib, Наукова
електронна бібліотека e-LIBRARY, InfoBase Index.**

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) 731-71-51, e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua
<http://mbt.onu.edu.ua>

© Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова, 2024

Establisher
Odesa I. I. Mechnikov National University

Identifier in the Registry of Media: R30-01955

(Resolution of the National Council of Television and Radio Broadcasting of Ukraine No 1548 dated 23.11.2023)

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, Georgia), 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 (Dnipro, Ukraine)

Scientific Editor V. O. Ivanytsia

All articles accepted for publishing are subject to peer review

Approved for publishing by the Academic Council of

Odesa I. I. Mechnikov National University

As per Order of the Ministry of Education and Science of Ukraine No 1301 dated 15.10.2019 the journal is included in the List of Specialist Scientific Publications of Ukraine (Category "B").

The journal is abstracted and indexed in the following databases: "Ukrainica Scientific", Index Copernicus International Journals Master List, Scientific Periodicals of Ukraine (V. I. Vernadskyi National Library of Ukraine), Ulrich's Periodicals Directory, Scientific Periodicals of Ukraine (journal.uran.ua), Odesa I. I. Mechnikov National University's Electronic Archive-Repository, Google Scholar, BASE Search, CiteFactor, Advanced Sciences Index, ResearchBib, e-LIBRARY, InfoBase Index.

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

A d d r e s s:

Odesa I. I. Mechnikov National University,

2 Dvorianska St, Odesa, 65082, Ukraine

tel.: +38 (048) 731-71-51, e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

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

© Odesa I. I. Mechnikov
National University, 2024

ЗМІСТ

ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

О. В. Сашук, Т. В. Гудзенко, В. О. Іваниця МІКРООРГАНІЗМИ МОРСЬКИХ ХОЛОДНИХ ПРОСОЧУВАНЬ ВУГЛЕВОДНІВ	6
--	---

М. Б. Галкін, І. В. Страшнова, А. В. Андрющенко ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У БІОРЕМЕДІАЦІЇ ҐРУНТІВ, ЗАБРУДНЕНИХ ВНАСЛІДОК БОЙОВИХ ДІЙ	28
--	----

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

А. Г. Мерліч, О. Ю. Кальницька, М. В. Шутило, О. О. Ковтун, В. О. Іваниця ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАКТОБАКТЕРІЙ З ВОДИ ТА МІДІЙ ЧОРНОГО МОРЯ З ПОТЕНЦІАЛОМ ДО ПРОДУКЦІЇ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ СПОЛУК	56
---	----

І. В. Страшнова, А. К. Машкова, Г. В. Лісютін, Т. В. Іваниця АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ АКТИНОБАКТЕРІЙ, ВИДЛЕНИХ ІЗ ГУБОК <i>HALICLONA</i> SPP. ОДЕСЬКОЇ ЗАТОКИ	69
---	----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	79
---	----

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

O. V. Sashchuk, T. V. Gudzenko, V. O. Ivanytsia MICROORGANISMS OF MARINE COLD HYDROCARBON SEEPS	6
--	---

M. B. Galkin, I. V. Strashnova, A. V. Andryushchenko USE OF MICROORGANISMS IN BIOREMEDIATION OF SOILS CONTAMINATED AS A RESULT OF MILITARY ACTIONS	28
---	----

EXPERIMENTAL WORKS

A. G. Merlich, O. Iu. Kalnytska, M. V. Shutylo, O. O. Kovtun, V. O. Ivanytsia CHARACTERIZATION OF LACTOBACTERIA FROM THE BLACK SEA WATER AND MUSSELS WITH THE POTENTIAL TO PRODUCE ANTIBACTERIAL COMPOUNDS	56
--	----

I. V. Strashnova, A. K. Mashkova, G. V. Lisiutin, T. V. Ivanytsia ANTAGONISTIC ACTIVITY OF ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM SPONGES <i>HALICLONA</i> SPP. ODESA BAY	69
--	----

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	79
--------------------------------	----

О. В. Сашук, Т. В. Гудзенко, В. О. Іваниця

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38(067)525 46 25, e-mail: sashchuk@gmail.com

МІКРООРГАНІЗМИ МОРСЬКИХ ХОЛОДНИХ ПРОСОЧУВАНЬ ВУГЛЕВОДНІВ

Морські вуглеводневі просочування (сипи) завдяки своїм унікальним геофізичним та геохімічним характеристикам формують унікальні умови для розвитку специфічних мікробних спільнот, різноманітна та взаємопов'язана метаболічна діяльність яких лежить в основі глобальних екологічних процесів. В короткому огляді розглянуті геофізичні та хімічні передумови формування сипів та вуглеводневих флюїдів – джерел енергії та субстратів для метаболічних процесів, що опосередковані мікроорганізмами, які існують в даних екологічних нішах. Наведено інформацію про різноманітність мікроорганізмів в холодних вуглеводневих просочуваннях, їх метаболічний потенціал в умовах динамічного розвитку середовища.

Ключові слова: мікробне біорізноманіття, метаногенез, метанотрофи, вуглеводневі просочування, окиснення вуглеводнів, сульфатредукція.

Геофізичні та хімічні передумови формування вуглеводневих флюїдів

Вуглеводні в корисних копалинах існують у різних формах і їх складність варіює від найпростішої – метану до численних різноманітних складових нафти. Осадження багатих органікою матеріалів вздовж континентальних околиць створюють умови для подальшого утворення вуглеводнів за рахунок біологічних і термогенних процесів, які тривають протягом мільйонів років. У мілководних безкисневих відкладах метан утворюється лише шляхом метаногенезу опосередкованого мікроорганізмами. Зі збільшенням глибини в товщі осадів за рахунок геотермічного градієнту (температура підвищується на 20–50 °С з кожним кілометром, а на глибині 2500–5000 м температура становить більше 150 °С) створюються оптимальні умови для утворення термогенних вуглеводнів: С5-алканів і більш важких сполук – н-алканів, циклоалканів, ароматичних сполук та, з рештою, нафти [1, 36].

У відкладах вуглеводні накопичуються в пористих утвореннях породи - колекторах, а градієнт концентрації в середині колектора призводить до висхідного потоку вуглеводнів зі швидкістю, яка визначається пористістю колектора [1]. Вуглеводні рухаються через мережу розломів, які з'єднують глибокі резервуари під морським дном і під час цієї подорожі відбувається їх окиснення та мінералізація. Просочування вуглеводнів на морському дні

© О. В. Сашук, Т. В. Гудзенко, В. О. Іваниця, 2024



зумовлено надлишковим тиском, який існує в резервуарах, і повторно вводить нафту та газ у вуглецевий колообіг. Викиди вуглеводнів з глибоких резервуарів можуть мати імпульсний або постійний характер і тривати протягом короткого або тривалого періоду часу [36].

В осадових басейнах на міграцію вуглеводнів через систему розломів та пор впливає розподіл соляних структур [41]. Сіль є пластичною і її рух створює і постійно змінює структуру і рельєф вуглеводневого басейну вздовж морського дна та мережі розломів, які слугують магістралями, що направляють висхідний потік вуглеводнів. В процесі міграції вуглеводневих флюїдів з глибоких джерел через розломи та сольові структури хімічний склад флюїдів змінюється, таким чином створюючи чіткі геохімічні ознаки – підписи [12, 41]. За рахунок геохімічних та мікробних змін нафти та газу під час міграції через шари відкладів утворюються кінцеві продукти (CO_2 , CH_4) та органічні проміжні продукти. Взаємодія з соляними структурами ще більше змінює рідину, утворюючи розсоли, наповнені нафтою та газом. Взаємодія із розсолем та осадом збагачує вуглеводневі флюїди амонієм, фосфатом, силікатами та розчиненими органічними речовинами (РОР) [11,38]. На морському дні дані флюїди слугують джерелом енергії для мікроорганізмів, що вільно існують і хемосинтетично-симбіотичних асоціацій тварин [36]. Таким чином, уздовж усього континентального шельфу світового океану вуглеводні, що просочуються через донні породи, мають вирішальний вплив на біологічну різноманітність, хімічну складову та геологію даних середовищ існування [35].

Поверхневі прояви просочувань вуглеводнів – вуглеводневі сипи представляють собою ділянки морського дна, де витікають (просочуються) геодіфлюїди з глибоких джерел: нафта та/або газ переміщуються та скидаються природним шляхом у водяний потік. Донні відкладення в місцях просочення вуглеводнів часто насичені нафтою та газом. У холодних сипах флюїди, що просочуються, є прохолодними – температура навколишнього середовища рідко перевищує $10\text{ }^\circ\text{C}$, не киплять і мають рН близьке до нейтрального, в той час як рН гідротермальних рідин (температура $> 350\text{ }^\circ\text{C}$) є кислим (рН < 4). Хімічний склад викидних флюїдів також відрізняється: гідротермальні джерела викидають рідини, збагачені геогенним метаном, сірководнем, воднем і відновленими металами, тоді як холодні сипи викидають рідини, збагачені біогенними та термогенними газами, нафтою та розсолем (висококонцентровані розчини солей металів) різного складу. І, нарешті, швидкість викиду рідини у холодних сипах, як правило, нижча, ніж швидкість викиду рідини у гідротермальних отворах [61]. Як вуглеводневі сипи, так і гідротермальні джерела створюють унікальні геобіологічні ознаки місцевого середовища [35].

Вуглеводневі флюїди в комплексі з місцевим мікробіомом представляють собою потужні біореактори, які підтримують та реалізують безліч біогеохімічних процесів та реакцій, зокрема анаеробне окиснення метану (АОМ), сульфатредукція, метаногенез [6], і, таким чином, є ідеальним середовищем для вивчення мікробних взаємодій та симбіозу [20].

Холодним сипам, як і іншим водним середовищам існування, характерна окисно-відновна зональність – вертикальна стратифікація біогеохімічних



процесів трансформації органічної речовини у відкладах, що зумовлено відмінностями у кінетиці та термодинамічному виході енергії реакцій залежно від надходження донорів і акцепторів електронів і режиму фізичного змішування. Разом ці чинники диктують послідовне споживання доступних акцепторів електронів і постійне накопичення продуктів реакції в глибинному горизонті та на глибинних профілях [63].

Біогеохімічна окисно-відновна зональність при просочуванні вуглеводнів залежить від природи та концентрації відновлених субстратів у рідині (наприклад, нафти та газу, РОР, амонію, сульфідів), а також від величини та мінливості швидкості викиду [67]. За рахунок аеробного дихання генерується найбільше енергії, проте кількість кисню в таких умовах незначна і він швидко витрачається. Нітратредукція відбувається за рахунок відновлення нітрату до нітриту, а потім до оксиду азота або молекулярного азоту. Далі за енергоефективністю йде відновлення оксидів металів (заліза або марганцю). Відновлення сульфатів тісно пов'язано із окисненням сірки в біотичних і абіотичних процесах сульфатредукції. Синтез метану у холодних сипах відбувається за рахунок різноманітних механізмів, проте ймовірно найважливішим серед них є метилотрофний метаногенез [37]. Послідовність даних процесів пов'язана один з одним і може відбуватися одночасно. Метаболізм вуглеводнів, що залягають глибоко, або інших багатих на енергію субстратів у мілководних відкладеннях і поблизу межі осад-вода створює складне геохімічне середовище, яке керує метаболізмом мікроорганізмів [35]. Так, високі швидкості процесу сульфатредукції (СР) генерують сульфід, в наслідок чого стимулюється його окиснення мікроорганізмами, що вільно існують та симбіотичними мікроорганізмами [17]. Таким чином, біогеохімічні процеси у сипах дуже тісно зв'язані між собою, а системи просочування вуглеводневих флюїдів забезпечують одні з найвищих показників швидкості метаболізму, задокументованих у природному середовищі [10], хоча вони є досить варіабельними і залежать від багатьох геофізичних факторів середовища [35, 61].

Джерела енергії та субстратів для метаболічних процесів, опосередкованих мікроорганізмами

Високі запаси енергії та субстратів у вигляді вуглеводнів роблять сипи ідеальними середовищами існування для різноманітних мікроорганізмів і, відповідно, зручними моделями для вивчення закономірностей і регуляції мікробної динаміки, процесів і біогеохімічних циклів, а також є місцем відкриття нових таксонів мікроорганізмів і нових метаболічних шляхів.

Завдяки наявній широкій різноманітності мікроорганізмів сипи сприяють глобальним процесам елементарного колообігу, зокрема вуглецю, і регулюють обмін між стародавнім вуглицем із глибоких вуглеводневих резервуарів, і активним сучасним. В реакціях окиснення метану, нафти та інших алканів вуглець виступає основним донором електронів. Акцептором найчастіше в холодних сипах слугують сульфати завдяки їх високій концентрації в морській воді (до 28мМ) [9, 10, 32, 60]. Не зважаючи на те, що вуглеводні є енергетично багатими субстратами, їх елементарний склад достатньо бідний, і це, в свою чергу накладає ряд обмежень на реалізацію метаболічних сцена-



рив. Азот і фосфор являються чинниками, які підвищують рівень метаболічної активності. Біологічна фіксація азоту присутня в холодних просочуваннях [15, 16, 47], є важливою і не рідко зустрічається. До фізіологічних груп мікроорганізмів, що опосередковують фіксацію N_2 у витоках, включають потенційно метаногенні археї, метанотрофні археї та сульфатвідновлювальні бактерії [3, 15]. Фосфор потрапляє на морське дно до відкладень шляхом осідання з поверхні у вигляді органічного/неорганічного фосфору або через скидання розсолів із глибинних колекторів. Відомо, що викид розсолів є важливим джерелом N і P у глибоке море, хоча регіональна та глобальна величина цього надходження не обмежена. У таких районах, як Перська затока, де просочування вуглеводневих флюїдів у вигляді розсолу є поширеним явищем, надходження фосфору можуть бути значними. Такий фосфор може бути фіксований і концентрований мікроорганізмами у вигляді поліфосфатів, які окиснюють сірку, наприклад, гігантські сіркоокиснювальні бактерії *Beggiatoa* і *Thiomargarita*, що безсумнівно відіграє важливу роль у колообігу фосфору [33].

Процеси, опосередковані діяльністю мікроорганізмів

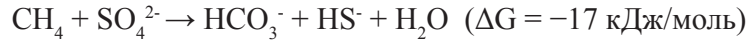
В холодних сипах внаслідок швидкого споживання кисню більша частина осаду є аноксичною, де переважають анаеробні метаболізми: окиснення вуглеводнів (метану, алканів), яке часто поєднується із сульфатредукцією [27, 34]. Кисень швидко споживається мікроорганізмами, які живуть у верхніх шарах (кілька мм) осаду або функціонують у симбіозі з тваринами на межі осад-вода [6]. Швидке споживання кисню відбувається також внаслідок діяльності мікроорганізмів, що існують вільно та симбіотичних тіотрофних і метанотрофних мікроорганізмів [6, 20].

Метан, що просочується з вуглеводневими флюїдами може мати біогенне та термогенне походження. Біогенний метан утворюється трьома способами: гідрогенотрофним (відновлення бікарбонату до метану з використанням водню як відновника), ацетокластичним (ацетатне бродиння дає CH_4 і CO_2) і метилотрофним (метанол, метантіол, диметилсульфід або інші прості субстрати) метаногенезом [42, 45]. Термогенні та біогенні джерела метану можна розрізнити за допомогою вимірювання стабільного ізотопного складу вуглецю ($\delta^{13}C$) і дейтерію (δD). Метан має дуже низький показник $\delta^{13}C$: біогенний метан порядку – 60 ‰, термогенний – близько – 40 ‰. [53]. Не зважаючи на те, що метаногенез в холодних просочуваннях відбувається за допомогою всіх відомих механізмів, метилотрофні процеси є найбільш значущими [14, 64, 70]. Це може бути пов'язано з тим, що більш низька температура обмежує перебіг гідрогенотрофного та ацетокластичного метаногенезу, в той час як метилотрофний метаногенез низька температура майже не впливає [14].

Анаеробне окиснення метану (АОМ) – центральний процес у вуглецевому циклі за анаеробних умов, який зменшує кількість метану, що вивільняється з ґрунтів та відкладень у водойми і, як наслідок, в атмосферу [10, 40]. Метан є кліматично активним парниковим газом, а морські відкладення містять величезні запаси метану у вигляді розчиненого газу та газового гідрату. Лабораторні експерименти з багатими на метан осадами виявили синтрофний зв'язок між мікроорганізмами, відповідальними за сульфатредукцію (SR) та



АОМ. При окисненні метану сульфати слугують акцепторами електронів, що й призводить до відновлення сульфатів до сульфідів [36]:



За умов високих концентрацій метану у флюїдах АОМ може досягати надзвичайно високих рівнів, що ймовірно пов'язано з використанням акцепторів електронів, відмінних від сульфатів і, таким чином, АОМ одночасно може проходити декількома шляхами [10, 11]. Швидка рециркуляція сірки важлива для підтримки високих показників СР, пов'язаної з АОМ, які спостерігаються за вуглеводневих просочувань [10, 44]. Важливими для підтримки високої швидкості АОМ є також процеси відновлення азоту та металів (залізо, марганець) [11]. Дослідниками було виявлено, що в холодних морських відкладах сульфатредуктори можуть бути залучені в незначній мірі в процесах мінералізації органічної речовини, тоді як мікроорганізми – відновники металів переважають. Тут канонічні сульфатредуктори надають перевагу автотрофному способу існування, використовуючи водень як донор електронів, в той час як металоредукувальні бактерії беруть участь в гетеротрофному циклі органічної речовини [68]. Таким чином, можливість використання різних акцепторів і донорів електронів залежно від їх наявності АОМ стають ефективним і дієвим механізмом утилізації метану при вуглеводневих просочуваннях за різних екологічних умов [11, 52].

Мікробне біорізноманіття холодних сипів

Просочування вуглеводнів в холодних сипах стимулює формування різноманітних мікробних спільнот, які є посередниками в метаногенезі, окисненні вуглеводнів, сульфатредукції і безлічі інших взаємопов'язаних процесів. За допомогою метагеномних досліджень було виявлено відмінності у складі мікробіому та їх розподілі в місцях вуглеводневих просочувань та у фонових зонах [54, 56, 57, 59]. Крім того спостерігають відмінності у метаболічному складі та метаболічному потенціалі в холодних та гідротермальних просочуваннях.

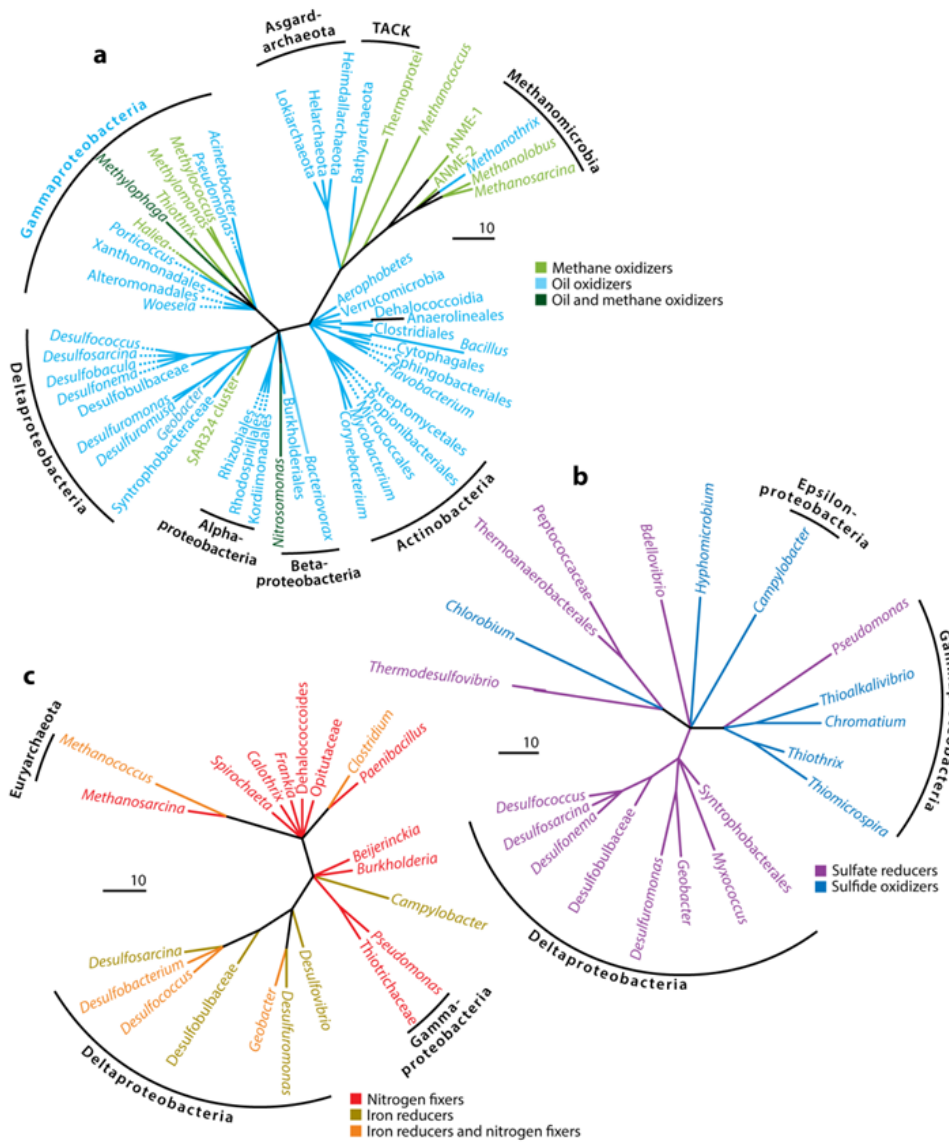
Для басейну Гуаймос Каліфорнійської затоки (Мексика) були проведені метагеномні дослідження і реконструйовані геноми мікробних спільнот з гідротермальних вуглеводневих просочувань і найближчих до них холодних сипів [7]. На відміну від результатів, отриманих із холодних вуглеводневих сипів, мікробні спільноти гідротермальних більш різноманітні за складом і археї тут переважають над бактеріями [30].

Дослідження основних метаболічних генів показало наявність генів загального колообігу вуглецю в усіх досліджуваних місцях. Проте гени ферментів, залучених в кисневому диханні характерніші холодним просочуванням, а у фонових зонах та гідротермальних сипах вони виявляються у значно менших кількостях. Гени ферментів, залучені в процесах ферментації були знайдені як в зонах вуглеводневих просочувань, так і у фонових. Гени ферментів денітрифікації найчастіше зустрічаються в холодних просочуваннях та негли-



боких ділянок, а ген *msrA* був повністю відсутній у ділянках, де вуглеводневі просочування не фіксувалися [17].

Філогенетичний розподіл основних груп мікроорганізмів, що є мешканцями вуглеводневих просочувань, залежно від їх функціонального навантаження, представлено на рис. 1 [36]. Проте дані представлені на рисунку не є повними, постійно доповнюються та уточнюються.



Joye SB. 2020. Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 48:205–31

Рис. 1. Філогенетичне різноманіття мікроорганізмів, представлених в холодних вуглеводневих сипах [36]

Fig. 1. Phylogenetic diversity of microorganisms of cold hydrocarbon seeps [36]



Анаеробні окиснювачі вуглеводнів нафти, метану (ANME) та організми, які можуть бути посередниками окиснення як нафти, так і метану, представлено на рис. 1а. Здатність метаболізувати метан, нафту та алкани виявлена у величезній кількості мікроорганізмів у всіх відомих філумах, які широко представлені в морських середовищах, включаючи системи холодних просочувань, гідротермальних джерел та багатих на органіку та метан відкладах [5, 8]. Основними чинниками, що контролюють розповсюдження ANME являється наявність метану та сульфату, або інших кінцевих акцепторів електронів, які можуть підтримувати АОМ. Як і для будь-яких мікроорганізмів важливими також є інші чинники навколишнього середовища, такі як температура, солоність, рівень рН.

На основі філогенетичного аналізу генів 16S рРНК ANME були згруповані в три окремих класи ANME-1, ANME-2 та ANME-3 [39, 49]. Усі метанотрофи філогенетично пов'язані з різними групами метаногенних архей [40]. ANME-2 та ANME-3 об'єднані в порядок *Methanosarcinales*, а ANME-1 належить до нового порядку, який має віддалені зв'язки з порядками *Methanosarcinales* і *Methanomicrobiales* [40]. Серед усіх трьох класів ANME-2 і ANME-3 найчастіше знаходять в холодних сипах, тоді як представники ANME-1 мешкають в середовищах із широким діапазоном температур та солоності [5]. Завдяки великій кількості морських проб, зібраних з усього світу, та за допомогою молекулярно-генетичного аналізу отримано величезну кількість послідовностей генів 16S рРНК та *mcrA* архей (метил-коМ-редуктази – ключовий фермент метаногенезу, також може каталізувати АОМ через зворотній метаногенез) [58], що дозволило розділити метанотрофи на підгрупи: ANME-1 – на ANME-1a і ANME-1b, ANME-2 – на чотири підгрупи ANME-2a, ANME-2b, ANME-2c і ANME-2d, а для ANME-3 підгрупи досі не визначені [5].

Із розвитком метагеномних досліджень список учасників, що беруть участь у різних метаболічних процесах, які відбуваються в місцях вуглеводневих просочувань, постійно розширюється, та стає зрозумілою їх роль і місце у даних процесах [13, 18, 26, 29]. Метагенез та АОМ через метил-коМ-редуктазу (як ключового ферменту) були запропоновані як основні шляхи метаболізму в архей. Метаболізм алканів на основі даного ферментативного апарату у різних груп архей (*Archaeoglobi*, *Hadesarchaeota*, архей суперфілума TACK, включаючи *Nezhaarchaeota*, *Korarchaeota* та *Verstraetearchaeota*) міг еволюціонувати під дією навколишніх факторів [66]. У представників *Hadesarchaeota* та *Archaeoglobi* метил-коМ-редуктаза сильно відрізняється від редуктаз інших архей, що дозволяє їм існувати на неметанових алканах. У архей *Archaeoglobi* і *Korarchaeota* виявлена здатність як до метаногенезу, так і до сульфатредукції, що дозволяє зробити припущення, що вони володіють потенціалом до поєднання обох шляхів метаболізму в окремих організмах [66]. Окрім добре відомих метанотрофів, окиснювачів нафти (ANME) та сульфатредукторів (зазвичай *Deltaproteobacteria*), здатність до окиснення вуглеводнів нафти знайдена також у представників філумів *Actinobacteria* та *Gammaproteobacteria*. До інших поширених архейних ліній – окиснювачів вуглеводнів відносять



морську бентосну групу В та *Bathyarchaeota*, а також протеобактерії (*Delta*-, *Epsilon*- і *Gamma*proteobacteria), *Bacteroidetes* та *Chloroflexi* [19].

Метанотрофи зазвичай є облигатними організмами, тобто здатні споживати лише метан, а не інші алкани з більш довгим ланцюгом. Здатність до окиснення вуглеводнів нафти та метану несподівано була виявлена у метаногених архей *Bathyarchaeota* [24]. Бактерії, що метаболізують інші газоподібні алкани – компоненти природного газу, наприклад, пропан, також відомі і охарактеризовані, проте вони не окиснюють метан. Але нещодавно був виявлений факультативний метанотроф *Methylocella silvestri*, який окрім метану здатний споживати інші компоненти природного газу – етан і пропан [25]. Отже, цілком вірогідно, що анаеробні окиснювачі метану та алканів є набагато більш поширеними, ніж вважалося раніше.

Донні структури Чорного моря є особливим середовищем для метанотрофів ANME-1 і ANME-2, які існують тут у вигляді товстих мікробних матів товщиною 2–10 см, скріплених карбонатними відкладами (димоходами) на глибині 35–2000 м [50, 62]. В Чорному морі була виявлена величезна карбонатна труба висотою 4 м та шириною до 1 м, яка містила мікробний мат рожевого кольору з переважанням ANME-1 у мікробному складі та найвищими на той момент показниками АОМ в природних системах [46].

Хемоавтотрофні та гетеротрофні процеси тут тісно взаємопов'язані: відбувається окиснення та трансформація вуглеводнів, що поєднує вуглеводневий метаболізм з іншими процесами, які здійснюють мікроорганізми – сульфатредукцією, фіксацією азоту тощо (рис. 1 b, c), і, таким чином, відбувається підживлення високопродуктивних та різноманітних екосистем.

Археї групи ANME-1 беруть участь у криптичному колообігу метану, який існує за рахунок постійної сульфатредукції, що відбувається в межах переходу сульфат-метан осадового горизонту. Для реалізації цього процесу залучені археї, які володіють ферментативним апаратом як для синтезу, так і для споживання метану [4]. Крім того, в холодних вуглеводневих просочуваннях Мексиканської затоки були виявлені та ідентифіковані нові сульфатредуктори, які здатні деградувати, лише пропан і бутан. Вони адаптовані до низької температури та демонструють найбільші швидкості відновлення сульфату при 16–20 °С. Аналіз бібліотек генів 16S рРНК показав переважання унікального філотипу, пов'язаного з кластером *Desulfosarcina-Desulfococcus* у межах *Deltaproteobacteria* [31, 60]. Сульфатвідновлювальні і сульфідокиснювальні бактерії представлені в основному бактеріями класів *Epsilonproteobacteria*, *Gamma*proteobacteria та *Deltaproteobacteria*, але представники *Clostridiales* також здатні до сульфатвідновлення [65]. Сульфатредукція притаманна найбільше дельтапротеобактеріям, тоді як в процесах окиснення сірки залучені в основному гамапротеобактерії та епсилонпротеобактерії [57]. Найпоширеніші сульфідні окиснювачі належать до представників родів *Beggiatoales*, *Thioploca* та *Thiothrix* родини *Thiotrichaceae*. Дослідження спільнот сульфатредукторів в деяких морських газових та нафтових витоках виявило широку розповсюдженість та різноманітність ацетат-окиснювальних бактерій родів *Desulfosarcina* і *Desulfococcus*, які також впливають на колообіг вуглецю [51].



Крім того, здатність фіксувати азот і відновлювати оксиди заліза дуже поширена у холодних сипах, що підкреслює їх потенційну важливість в умовах існування вуглеводневих просочувань [69]. За оцінками в процесі АОМ, що супроводжується сульфатредукцією, окиснюється до 90 % усього метану, що утворюється в морських відкладах і головними чинниками цього виступають метанотрофні археї (ANME) та сульфатредукувальні бактерії. Припускають, що нижче зони сульфат-метанового переходу за умов високої концентрації розчиненого заліза, низької концентрації сульфатів і високої концентрації метану, а також у присутності оксидів заліза, частина цього метану окиснюється в АОМ, де основним акцептором електронів виступає Fe(III) [2, 43]. Такі середовища широко розповсюджені в мілководних відкладах від прибережних шельфів до глибоководних морських ділянок континентальних окраїн (Балтійське, Чорне море) [21, 22].

Хоча досі не ідентифіковані мікроорганізми, відповідальні за даний процес, було показано, що за умов пригнічення сульфатредукції окиснення метану відбувається за рахунок відновлення різних оксидів заліза, але не марганцю. При цьому виявляється значне збільшення кількості археї ANME-2a [2].

Метанотрофи, які використовують нітрит (дві специфічні групи археї *Methanoperedens nitroreducens* (підгрупа ANME-2d)) або нітрат (бактерії *Methylomirabilis oxyfera*) як акцептори електронів найчастіше виявляють в анаеробних прісноводних відкладах [23, 28]. Під час АОМ денітрифікатор *M. oxyfera* відновлює нітрит до оксиду азоту з подальшим перетворенням в молекулярний азот (N_2) та кисень (O_2). Останній використовується при окисненні метану до вуглекислого газу [23]. Археї ANME-2d можуть здійснювати денітрифікувальне АОМ без синтрофних партнерів, де нітрит може бути відновлений до азоту (N_2). Амоній, присутній в POP, може бути окиснений до азоту (N_2) морськими бактеріями роду *Scalindua* (Annamox) [48]. При цьому було показано, що в у вуглеводневих сипах кількість денітрифікаторів дуже незначна, а окиснювачі амонію (Annamox) зустрічаються скоріше у фонових ділянках донних відкладень [69].

Отже, не зважаючи на всі проведені дослідження, включаючи метагеномні та метаболомні, все ще дуже обмеженим є розуміння просторового біорізноманіття, функціонування в умовах динамічного розвитку середовища та метаболічного потенціалу мікроорганізмів. Просочування вуглеводнів є постійною ознакою схилових і шельфових середовищ по всій Земній кулі, які надають унікальні геологічні, біогеохімічні та геобіологічні ознаки морському дну [55]. Геологія, що лежить в основі, створює фізико-хімічні умови, структуру і контролює динаміку вуглеводневих флюїдів і, таким чином формує середовище існування для первинних мешканців – мікроорганізмів, які в свою чергу є двигуном колообігу речовин та енергії і фундаментом глобальної екологічної піраміди.

Спеціалізовані мікробні спільноти, що існують у місцях вуглеводневих просочувань добре налаштовані на місцеві фізичні та геохімічні режими. У зв'язку зі швидким споживанням кисню поблизу межі осади-вода мікробни-



ми спільнотами, що вільно існують та симбіотичними, а також диханням тварин, анаеробний метаболізм є переважальним у вуглеводневих просочуваннях, а сульфатредукція та анаеробне окиснення метану є мікробіологічними процесами, які привертають велику увагу дослідників. Наявні дані свідчать також про тісний зв'язок АОМ з іншими біогеохімічними процесами, що відбуваються в місцях вуглеводневих просочувань, такими як відновлення нітратів/нітритів, оксидів металів (Fe(III) та Mn(IV)), які, ймовірно, є не менш важливими, ніж сульфатредукція.

O. V. Sashchuk, T. V. Gudzenko, V. O. Ivanytsia

Odesa I. I. Mechnikov National University,
2 Dvorianska St, Odesa, 65082, Ukraine
tel.: +38(067)525 46 25, e-mail: sashchuk@gmail.com

MICROORGANISMS OF MARINE COLD HYDROCARBON SEEPS

Summary

Marine hydrocarbon seeps, due to their unique geophysical and geochemical characteristics, form unique conditions for the development of specific microbial communities. Diverse and interconnected metabolic activities of them underlie global ecological processes. In this review were considered the geophysical and chemical conditions for the formation of seepages and hydrocarbon fluids - energy sources and substrates for metabolic processes mediated by microorganisms that exist in these ecological niches. It was presented the information about microbial biodiversity in cold hydrocarbon seeps, its metabolic potential in conditions of dynamic environmental development.

Key words: hydrocarbon seeps, anaerobic oxidation of methane (AOM), sulphate reduction, methanogenesis, microbial biodiversity.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Abrams M.A., Dahdah N.* Surface sediment hydrocarbons as indicators of subsurface hydrocarbons: field calibration of existing and new surface geochemistry methods in the Marco Polo area, Gulf of Mexico // *AAPG Bull.* – 2011. – V. 95 (11). – P. 1907–1935. DOI:10.1306/03211110130
2. *Aromokeye D.A., Kulkarni A.C., Elvert M., Wegener G., Henkel S., et al.* Rates and Microbial Players of Iron-Driven Anaerobic Oxidation of Methane in Methanic Marine Sediments // *Frontiers in Microbiology.* – 2020. – V. 10. – Art. 3041 DOI: 10.3389/fmicb.2019.03041
3. *Bertics V.J., Loscher C.R., Salonen I., Dale A.W., Schmitz R.A., Treude T.* Occurrence of benthic microbial nitrogen fixation coupled to sulfate reduction in the seasonally hypoxic Eckernförde Bay, Baltic Sea // *Biogeosciences.* – 2013. – V. 10. – P. 1243–58. <https://doi.org/10.5194/bg-10-1243-2013>
4. *Beulig F., Røy H., McGlynn S.E., Jørgensen B.B.* Cryptic CH₄ cycling in the sulfate–methane transition of marine sediments apparently mediated by



- ANME-1 archaea // *The ISME Journal*. – 2019. – V. 13. – P. 250–262. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0273-z>
5. *Bhattarai S., Cassarini C., Lens P.N.L.* 2019. Physiology and Distribution of Archaeal Methanotrophs That Couple Anaerobic Oxidation of Methane with Sulfate Reduction // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2019. – V. 83 (3):10.1128/membr.00074-18. <https://doi.org/10.1128/membr.00074-18>
 6. *Boetius A., Wenzhöfer F.* 2013. Seafloor oxygen consumption fuelled by methane from cold seeps // *Nat. Geosci.* – 2013. – V. 6 (9). – P. 725–734. DOI:10.1038/ngeo1926
 7. *Bojanova D.P., De Anda V.Y., Haghnegahdar M.A., Teske A.P., Ash J.L., Young E.D., Baker B.J., LaRowe D.E., Amend J.P.* Well-hidden methanogenesis in deep, organic-rich sediments of Guaymas Basin // *ISME J.* – 2023. – V. 17 (11). -P. 1828-1838. DOI: 10.1038/s41396-023-01485-y.
 8. *Borrel G., Adam P.S., McKay J.J., Chen L.-X., Sierra-Garcia I.N. et al.* Wide diversity of methane and short-chain alkane metabolisms in uncultured archaea // *Nat. Microbiol.* – 2019. – V. 4 (4). – P. 603–613. DOI: 10.1038/s41564-019-0363-3.
 9. *Bose A., Rogers D.R., Adams M.M., Joye S.B., Girguis P.R.* Geomicrobiological linkages between short-chain alkane consumption and sulfate reduction in seep sediments // *Front. Microbiol.* – 2013. – V. 4. – P. 386. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00386
 10. *Bowles M.W., Samarkin V.A., Bowles K.M.L., Joye S.B.* Weak coupling between sulfate reduction and the anaerobic oxidation of methane in methane-rich seafloor sediments in ex situ incubations // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – 2010. – V. 75 (2). – P. 500–519. DOI:10.1016/j.gca.2010.09.043
 11. *Bowles M.W., Hunter K.S., Samarkin V., Joye S.B.* Patterns and variability in geochemical signatures and microbial activity within and between diverse cold seep habitats along the lower continental slope, Northern Gulf of Mexico // *Deep Sea Res. II. Topical Studies in Oceanography* – 2016. – V. 129. – P. 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2016.02.011>
 12. *Brun J.-P., Fort X.* Growth of continental shelves at salt margins // *Front. Earth Sci.* – 2018. – V. 6. – Art. 209. <https://doi.org/10.3389/feart.2018.00209>
 13. *Chen J., Li Y., Zhong C., Xu Z., Lu G., Jing H., Liu H.* Genomic Insights into Niche Partitioning across Sediment Depth among Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea in Global Methane Seeps // *mSystems.* – 2023. – V. 8 (2). – e0117922. DOI: 10.1128/msystems.01179-22.
 14. *Chen Y., Wu N., Liu C., Mi T., Li J., He X., Li S., Sun Z., Zhen Y.* Methanogenesis pathways of methanogens and their responses to substrates and temperature in sediments from the South Yellow Sea // *Sci Total Environ.* – 2022. – V. 815. – P. 1526-1545. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.152645.
 15. *Dekas A.E., Poretsky R.S., Orphan V.J.* 2009. Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia // *Science.* – 2009. – V. 326 (5951). – P. 422–426. DOI: 10.1126/science.1178223
 16. *Dekas A.E., Chadwick G.L., Bowles M.W., Joye S.B., Orphan V.J.* Spatial distribution of nitrogen fixation in methane seep sediment and the role of the



- ANME archaea // *Environ. Microbiol.* – 2014. – V. 16 (10). – P. 3012–3029. DOI: 10.1111/1462-2920.12247
17. *Dombrowski N., Teske A.P., Baker B.J.* Expansive microbial metabolic versatility and biodiversity in dynamic Guaymas Basin hydrothermal sediments // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – Art. 4999. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07418-0>
 18. *Dong X., Greening C., Rattray J.E., Chakraborty A., Chuvochina M. et al.* 2019. Metabolic potential of uncultured bacteria and archaea associated with petroleum seepage in deep-sea sediments // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10 (1). – Art. 1816. DOI: 10.1038/s41467-019-09747-0
 19. *Dowell F., Cardman Z., Dasarathy S., Kellermann M.Y., Lipp J.S., Ruff S.E., Biddle J.F., McKay L.J., MacGregor B.J., Lloyd K.G., Albert D.B., Mendlovitz H., Hinrichs K.U., Teske A.* Microbial Communities in Methane- and Short Chain Alkane-Rich Hydrothermal Sediments of Guaymas Basin // *Front Microbiol.* – 2016. – V. 7. – Art. 17. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00017.
 20. *Dubilier N., Bergin C., Lott C.* Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – V. 6 (10). – P. 725–740. DOI: 10.1038/nrmicro1992
 21. *Egger M., Kraal P., Jilbert T., Sulu-Gambari F., Sapart C.J., Röckmann T., Slomp C.P.* Anaerobic oxidation of methane alters sediment records of sulfur, iron and phosphorus in the Black Sea // *Biogeosciences.* – 2016. – V. 13 (18). – P. 5333–5355. DOI:10.5194/bg-13-5333-2016
 22. *Egger M., Hagens M., Sapart C.J., Dijkstra N., Van Helmond N.A.G.M., Moggollón J.M., et al.* Iron oxide reduction in methane-rich deep Baltic Sea sediments // *Geochim. Cosmochim. Acta* – 2017. – V. 207. – P. 256–276. DOI: 10.1016/j.gca.2017.03.019
 23. *Ettwig K.F., Butler M.K., Le Paslier D., Pelletier E., Mangenot S., Kuypers M.M.M., Schreiber F., Dutilh B.E., Zedelius J., de Beer D., Gloerich J., Wessels H.J.C.T., van Alen T., Luesken F., Wu M.L., van de Pas-Schoonen K.T., Op den Camp H.J.M., Janssen-Megens E.M., Francoijs K.-J., Stunnenberg H., Weissenbach J., Jetten M.S.M., Strous M.* Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria // *Nature.* – 2010. – V. 464. – P. 543–548. <https://doi.org/10.1038/nature08883>
 24. *Evans P.N., Parks D.H., Chadwick G.L., Robbins S.J., Orphan V.J. et al.* Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics // *Science.* – 2015. – V. 350 (6259). – P. 434–438. DOI: 10.1126/science.aac7745
 25. *Farhan Ul Haque M., Crombie A.T., Ensminger S.A., Baciu C. and Murrell J.C.* Facultative methanotrophs are abundant at terrestrial natural gas seeps // *Microbiome.* – 2018. – V. 6. – Art. 18 <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0500-x>
 26. *Farhan Ul Haque M., Xu H.-J., Murrell J.C., Crombie A.* Facultative methanotrophs – diversity, genetics, molecular ecology and biotechnological potential: a mini-review // *Microbiology.* – 2020. – V. 166. – P. 894–908. DOI 10.1099/mic.0.000977



27. Grünke S., Lichtschlag A., de Beer D., Felden J., Ramette A. et al. Mats of psychrophilic thiotrophic bacteria associated with cold seeps of the Barents Sea // *Biogeosciences*. – 2012. – V. 9 (8). – P. 2947–2960. <https://doi.org/10.5194/bg-9-2947-2012>
28. Haroon M.F., Hu S., Shi Y., Imelfort M., Keller J., Hugenholtz P., Yuan Z., Tyson G.W. 2013. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage // *Nature*. – 2013. – V. 500 (7464). – P. 567–570. DOI: 10.1038/nature12375
29. Hawley E.R., Piao H., Scott N.M., Malfatti S., Pagani I. et al. Metagenomic analysis of microbial consortium from natural crude oil that seeps into the marine ecosystem offshore Southern California // *Stand. Genom. Sci.* – 2014. – V. 9 (3). – P. 1259–1274. DOI:10.4056/sigs.5029016
30. Hinkle J.E., Mara P., Beaudoin D.J., Edgcomb V.P., Teske A.P. A PCR-Based Survey of Methane-Cycling Archaea in Methane-Soaked Subsurface Sediments of Guaymas Basin, Gulf of California // *Microorganisms*. – 2023. – V. 11(12). – P. 2956. DOI: 10.3390/microorganisms11122956.
31. Jaekel U., Musat N., Adam B., Kuypers M., Grundmann I. O., Musat F. Anaerobic degradation of propane and butane by sulfate-reducing bacteria enriched from marine hydrocarbon cold seeps // *The ISME Journal*. – 2013. – V. 7. – P. 885–895. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.159>
32. Jaekel U., Zedelius J., Wilkes H., Musat F. Anaerobic degradation of cyclohexane by sulfate-reducing bacteria from hydrocarbon-contaminated marine sediments // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6. – Art. 116. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00116>
33. Jones D.S., Flood B.E., Bailey J.E. Metatranscriptomic insights into polyphosphate metabolism in marine sediments // *ISME J.* – 2015. – V. 10. – P. 1015–1019. DOI: 10.1038/ismej.2015.169
34. Joye S.B., Bowles M.W., Samarkin V.A., Hunter K.S., Niemann H. Biogeochemical signatures and microbial activity of different cold seep habitats along the Gulf of Mexico lower slope // *Deep Sea Res. II*. – 2010. – Vol. 57. – P. 1990–2001. DOI:10.1016/j.dsr2.2010.06.001
35. Joye S.B., Kleindienst S. Hydrocarbon seep ecosystems / *Life in Extreme Environments*. Kallmeyer J. - Berlin: DeGruyter Publ., 2017. – P. 33–52. DOI:10.1515/9783110493672-002
36. Joye S.B. The Geology and Biogeochemistry of Hydrocarbon Seeps // *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. – 2020. – V. 48. – P. 205–231. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-063016-020052>
37. Kappler A., Bryce C. Cryptic biogeochemical cycles: unraveling hidden redox reactions // *Environ. Microbiol.* – 2017. – V. 19 (3). – P. 842–846. DOI:10.1111/1462-2920.13687
38. Kennicutt M.C. Oil and gas seeps in the Gulf of Mexico / *Habitats and Biota of the Gulf of Mexico: Before the Deepwater Horizon Oil Spill*. Ward C. – New York: Springer, 2017. – P. 275–358. DOI:10.1007/978-1-4939-3447-8_5



39. Knittel K., Lösekann T., Boetius A., Kort R., Amann R. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71 (1). – P. 467–479. doi: 10.1128/AEM.71.1.467-479.2005
40. Knittel K., Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2009. – V. 63. – P. 311–334. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093130
41. Kramer K.V., Shedd W.W. A 1.4-billion-pixel map of the Gulf of Mexico seafloor // *EOS Trans. AGU.* – 2017. – V. 98 (8). – P. 1010–1029. DOI:10.1029/2017EO073557
42. Kurth J.M., Huub J. M., Op den Camp, Welte C.U. Several ways one goal—methanogenesis from unconventional substrates // *Appl. Microb. Biotech.* – 2020. – V. 104. – P. 6839–6854. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10724-7>
43. Liang L., Wang Y., Sivan O., Wang F. Metal-dependent anaerobic methane oxidation in marine sediment: Insights from marine settings and other systems // *Sci China Life Sci.* – 2019. – V. 62(10). – P. 1287–1295. DOI: 10.1007/s11427-018-9554-5.
44. Litchschlag A., Felden J., Bruchert V., Boetius A., de Beer D. Geochemical processes and chemosynthetic primary production in different thiotrophic mats of the Håkon Mosby Mud Volcano (Barents Sea) // *Limnol. Oceanogr.* – 2010. – V. 55 (2). – P. 931–949. DOI:10.4319/lo.2010.55.2.0931
45. Lyu Z., Shao N., Akinyemi T., Whitman W.B. Methanogenesis // *Curr. Biol.* – 2018. – V. 28 (13). – P. R727–R732. DOI: 10.1016/j.cub.2018.05.021.
46. Marlow J.J., Steele J.A., Ziebis W., Thurber A.R., Levin L.A., Orphan V.J. Carbonate-hosted methanotrophy represents an unrecognized methane sink in the deep sea // *Nat. Commun.* – 2014. – V. 5. – Art. 5094. DOI: 10.1038/ncomms6094
47. Miyazaki J., Higa R., Toki T., Ashi J., Tsunogai U. et al. Molecular characterization of potential nitrogen fixation by anaerobic methane-oxidizing archaea in the methane seep sediments at the number 8 Kumano Knoll in the Kumano Basin, offshore of Japan // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 75 (22). – P. 7153–7162. DOI:10.1128/AEM.01184-09
48. Nie W.B., Ding J., Xie G.J., Tan X., Lu Y., Peng L., Liu B.F., Xing D.F., Yuan Z., Ren N. Simultaneous nitrate and sulfate dependent anaerobic oxidation of methane linking carbon, nitrogen and sulfur cycles // *Water Res.* – 2021. – V. 194. – Art. 116928. DOI: 10.1016/j.watres.2021.116928.
49. Niemann H., Losekann T., de Beer D., Elvert M., Nadalig T., Knittel K., Amann R., Sauter E.J., Schluter M., Klages M., Foucher J.P., Boetius A. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink // *Nature.* – 2006. – V. 443 (7113). – P. 854–858. DOI: 10.1038/nature05227
50. Novikova S.A., Shnyukov Y.F., Sokol E.V., Kozmenko O.A., Semenova D.V., Kutny V.A. A methane-derived carbonate build-up at a cold seep on the Crimean slope, north-western Black Sea // *Mar. Geol.* – 2015. – V. 363 (2). – P. 160–173. DOI: 10.1016/j.margeo.2015.02.008



51. *Orcutt B.N., Joye S.B., Kleindienst S., Knittel K., Ramette A., Reitz A., Samarkin V., Treude T., Boetius A.* Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments // *Deep Sea Res Part II: Top Stud. Oceanogr.* – 2010. – V. 57(21-23). – P. 2008–2021. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2010.05.014>
52. *Orcutt B.N., Lapham L.L., Delaney J., Sarode N., Marshall K.S. et al.* Microbial response to oil enrichment in Gulf of Mexico sediment measured using a novel long-term benthic lander system // *Elem. Sci. Anthr.* – 2017. – V. 5 (3). – P. 18. DOI: 10.1525/elementa.129
53. *Pohlman J.W., Bauer J.E., Waite W.F., Osburn C.L., Chapman N.R.* Methane hydrate-bearing seeps as a source of aged dissolved organic carbon to the oceans // *Nat. Geosci.* – 2011. – V. 4. – P. 37–41. <https://doi.org/10.1038/ngeo1016>
54. *Ristova P.P., Wenzhofer F., Ramette A., Felden J., Boetius A.* Spatial scales of bacterial community diversity at cold seeps (Eastern Mediterranean Sea) // *ISME J.* – 2014. – V. 9. – P. 1306–1318. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.217>
55. *Roberts H.H., Hardage B.A., Shedd W.W., Hunt J.Jr.* Seafloor reflectivity--an important seismic property for interpreting fluid/gas expulsion geology and the presence of gas hydrate // *The Leading Edge.* – 2006. – V. 25 (5). – P. 620–628. DOI: 10.1190/1.2202667
56. *Ruff S.E., Biddle J.F., Teske A.P., Knittel K., Boetius A., Ramette A.* Global dispersion and local diversification of the methane seep microbiome // *PNAS.* – 2015. – V. 112 (13). – P. 4015–4020. DOI: 10.1073/pnas.1421865112
57. *Ruff S.E., Felden J., Gruber-Vodicka H.R., Marcon Y., Knittel K. et al.* In situ development of a methanotrophic microbiome in deep-sea sediments // *ISME J.* - 2018. – V. 13 (1). – P. 197–213. DOI: 10.1038/s41396-018-0263-1
58. *Scheller S., Goenrich M., Boecher R., Thauer R.K., Jaun B.* The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane // *Nature.* – 2010. – V. 465 (7298). – P. 606–608. DOI: 10.1038/nature09015
59. *Semler A.C., Fortney J.L., Fulweiler R.W., Dekas A.E.* Cold Seeps on the Passive Northern U.S. Atlantic Margin Host Globally Representative Members of the Seep Microbiome with Locally Dominant Strains of Archaea // *Appl Environ Microbiol.* – 2022. – V. 88(11):e0046822. DOI: 10.1128/aem.00468-22.
60. *Singh R., Guzman M.S., Bose A.* Anaerobic oxidation of ethane, propane, and butane by marine microbes: a mini review // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8. -Art. 2056. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02056>
61. *Suess E.* Marine cold seeps and their manifestations: geological control, biogeochemical criteria and environmental conditions // *Int. J. Earth Sci.* – 2014. – V. 103 (7). – P. 1889–1916. DOI: 10.1007/s00531-014-1010-0
62. *Treude T., Knittel K., Blumenberg M., Seifert R., Boetius A.* Subsurface microbial methanotrophic mats in the Black Sea // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71 (10). – P. 6375–6378. DOI: 10.1128/AEM.71.10.6375-6378.2005



63. Vallino J., Algar C.K. The thermodynamics of marine biogeochemical cycles: Lotka revisited // *Annu. Rev. Mar. Sci.* – 2016. – V. 8. – P. 333–356. DOI: 10.1146/annurev-marine-010814-015843
64. Vigneron A., L'Haridon S., Godfroy A., Roussel E.G., Cragg B.A. et al. Evidence of active methanogen communities in shallow sediments of the Sonora Margin cold seeps // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2015. – V. 81 (10). – P. 3451–3459. DOI: 10.1128/AEM.00147-15
65. Vigneron A., Alsop E.B., Cruaud P., Pilibert G., King B. et al. Comparative metagenomics of hydrocarbon and methane seeps of the Gulf of Mexico // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7 (1). – Art. 16015. DOI: 10.1038/s41598-017-16375-5
66. Wang Y., Wegener G., Hou J., Wang F., Xiao X. Expanding anaerobic alkane metabolism in the domain of Archaea // *Nat. Microbiol.* – 2019. – V. 4. – P. 595–602. DOI: 10.1038/s41564-019-0364-2
67. Xin Y., Wu N., Sun Z., Wang H., Chen Y., Xu C., Geng W., Cao H., Zhang X., Zhai B., Yan D. Methane seepage intensity distinguish microbial communities in sediments at the Mid-Okinawa Trough // *Sci. Total. Environ.* – 2022. – V. 851(2). – Art.158213. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158213.
68. Yin X., Zhou G., Wang H., Han D., Maeke M., Richter-Heitmann T., Wunder L.C., Aromokeye D.A., Zhu Q.Z., Nimzyk R., Elvert M., Friedrich M.W. Unexpected carbon utilization activity of sulfate-reducing microorganisms in temperate and permanently cold marine sediments. // *ISME J.* – 2024. – V. 18(1):wrad014. DOI: 10.1093/ismejo/wrad014.
69. Zhao R., Summers Z.M., Christman G.D., Yoshimura K.M., Biddle J.F. Metagenomic views of microbial dynamics influenced by hydrocarbon seepage in sediments of the Gulf of Mexico // *Scientific Reports.* – 2020. – V. 10. – Art.5772. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62840-z>
70. Zhuang G.-C., Montgomery A., Sibert R.J., Rogener M.-K., Samarkin V.A., Joye S.B. Effects of pressure, methane concentration, sulfate reduction activity, and temperature on methane production in surface sediments of the Gulf of Mexico // *Limnol. Oceanogr.* – 2018. – V. 63 (5). – P. 2080–2092. DOI: 10.1002/lno.10925

REFERENCES

1. Abrams MA, Dahdah N. Surface sediment hydrocarbons as indicators of subsurface hydrocarbons: field calibration of existing and new surface geochemistry methods in the Marco Polo area, Gulf of Mexico. *AAPG Bulletin.* 2011; 95(11):1907-1935. DOI:10.1306/03211110130
2. Aromokeye DA, Kulkarni AC, Elvert M, Wegener G, Henkel S, Coffinet S, Eickhorst T, Oni OE, Richter-Heitmann T, Schnakenberg A, Taubner H, Wunder L, Yin X, Zhu Q, Hinrichs KU, Kasten S, Friedrich MW. Rates and Microbial Players of Iron-Driven Anaerobic Oxidation of Methane in Methanic Marine Sediments. *Front Microbiol.* 2020;10:3041. DOI: 10.3389/fmicb.2019.03041.
3. Bertics VJ, Loscher CR, Salonen I, Dale AW, Schmitz RA, Treude T. Occurrence of benthic microbial nitrogen fixation coupled to sulfate reduction in the seasonally hypoxic Eckernförde Bay, Baltic Sea. *Biogeosciences.* 2013; 10:1243–58. <https://doi.org/10.5194/bg-10-1243-2013>



4. Beulig F, Røy H, McGlynn SE, Jørgensen BB. Cryptic CH₄ cycling in the sulfate–methane transition of marine sediments apparently mediated by ANME-1 archaea. *The ISME Journal*. 2019; 13:250–262. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0273-z>
5. Bhattarai S, Cassarini C, Lens PNL. Physiology and Distribution of Archaeal Methanotrophs That Couple Anaerobic Oxidation of Methane with Sulfate Reduction. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2019; 83:10.1128/membr.00074-18. <https://doi.org/10.1128/membr.00074-18>
6. Boetius A, Wenzhöfer F. Seafloor oxygen consumption fuelled by methane from cold seeps. *Nat Geosci*. 2013; 6(9):725–34. DOI:10.1038/ngeo1926
7. Bojanova DP, De Anda VY, Haghnegahdar MA, Teske AP, Ash JL, Young ED, Baker BJ, LaRowe DE, Amend JP. Well-hidden methanogenesis in deep, organic-rich sediments of Guaymas Basin. *ISME J*. 2023; 17(11):1828-1838. DOI: 10.1038/s41396-023-01485-y.
8. Borrel G, Adam PS, McKay JJ, Chen L-X, Sierra-Garcia IN et al. Wide diversity of methane and short-chain alkane metabolisms in uncultured archaea. *Nat Microbiol*. 2019; 4(4):603–13. DOI:10.1038/s41564-019-0363-3
9. Bose A, Rogers DR, Adams MM, Joye SB, Girguis PR. Geomicrobiological linkages between short-chain alkane consumption and sulfate reduction in seep sediments. *Front Microbiol*. 2013; 4:386. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00386>
10. Bowles MW, Samarkin VA, Bowles KML, Joye SB. Weak coupling between sulfate reduction and the anaerobic oxidation of methane in methane-rich seafloor sediments in ex situ incubations. *Geochim Cosmochim Acta*. 2010; 75(2):500–519. DOI:10.1016/j.gca.2010.09.043
11. Bowles MW, Hunter KS, Samarkin V, Joye SB. Patterns and variability in geochemical signatures and microbial activity within and between diverse cold seep habitats along the lower continental slope, Northern Gulf of Mexico. *Deep Sea Res II*. 2016; 129:31–40. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2016.02.011>
12. Brun J-P, Fort X. Growth of continental shelves at salt margins. *Front. Earth Sci*. 2018; 6:209. <https://doi.org/10.3389/feart.2018.00209>
13. Chen J, Li Y, Zhong C, Xu Z, Lu G, Jing H, Liu H. Genomic Insights into Niche Partitioning across Sediment Depth among Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea in Global Methane Seeps. *mSystems*. 2023; 8(2):e0117922. DOI: 10.1128/mSystems.01179-22.
14. Chen Y, Wu N, Liu C, Mi T, Li J, He X, Li S, Sun Z, Zhen Y. Methanogenesis pathways of methanogens and their responses to substrates and temperature in sediments from the South Yellow Sea. *Sci Total Environ*. 2022; 815:152645. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.152645.
15. Dekas AE, Poretsky RS, Orphan VJ. Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia. *Science*. 2009; 326(5951):422–426. DOI: 10.1126/science.1178223
16. Dekas AE, Chadwick GL, Bowles MW, Joye SB, Orphan VJ. Spatial distribution of nitrogen fixation in methane seep sediment and the role of the ANME archaea. *Environ Microbiol*. 2014; 16(10):3012–29. DOI: 10.1111/1462-2920.12247



17. Dombrowski N, Teske AP, Baker BJ. Expansive microbial metabolic versatility and biodiversity in dynamic Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Nat Commun.* 2018; 9(1):4999. DOI: 10.1038/s41467-018-07418-0
18. Dong X, Greening C, Rattray JE, Chakraborty A, Chuvochina M et al. Metabolic potential of uncultured bacteria and archaea associated with petroleum seepage in deep-sea sediments. *Nat Commun.* 2019; 10(1):1816. DOI: 10.1038/s41467-019-09747-0
19. Dowell F et al. Microbial communities in methane- and short chain alkanerich hydrothermal sediments of Guaymas Basin. *Front Microbiol.* 2016; 7:17. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00017
20. Dubilier N, Bergin C, Lott C. Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6(10):725–740. DOI: 10.1038/nrmicro1992
21. Egger M, Kraal P, Jilbert T, Sulu-Gambari F, Sapart CJ, Röckmann T, Slomp CP. Anaerobic oxidation of methane alters sediment records of sulfur, iron and phosphorus in the Black Sea. *Biogeosciences.* 2016; 13:5333–5355 DOI:10.5194/bg-13-5333-2016
22. Egger M, Hagens M, Sapart CJ, Dijkstra N, Van Helmond NAGM, Mogollón JM et al. Iron oxide reduction in methane-rich deep Baltic Sea sediments. *Geochim Cosmochim Acta.* – 2017; 207:256–276. DOI: 10.1016/j.gca.2017.03.019
23. Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MMM, Schreiber F, Dutilh BE, Zedelius J, de Beer D, Gloerich J, Wessels HJCT, van Alen T, Luesken F, Wu ML, van de Pas-Schoonen KT, Op den Camp HJM, Janssen-Megens EM, Francoijs K-J, Stunnenberg H, Weissenbach J, Jetten MSM, Strous M. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature.* 2010; 464(7288):543–548. <https://doi.org/10.1038/nature08883>
24. Evans PN, Parks DH, Chadwick GL, Robbins SJ, Orphan VJ et al. Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science.* 2015; 350(6259):434–38. DOI: 10.1126/science.aac7745
25. Farhan Ul Haque M, Crombie AT, Ensminger SA, Baciu C, Murrell JC. Facultative methanotrophs are abundant at terrestrial natural gas seeps. *Microbiome.* 2018; 6:118. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0500-x>
26. Farhan Ul Haque M, Xu H-J, Murrell JC, Crombie A. Facultative methanotrophs – diversity, genetics, molecular ecology and biotechnological potential: a mini-review. *Microbiology.* 2020; 166:894–908 DOI 10.1099/mic.0.000977
27. Grünke S, Lichtschlag A, de Beer D, Felden J, Ramette A et al. Mats of psychrophilic thiotrophic bacteria associated with cold seeps of the Barents Sea. *Biogeosciences.* 2012; 9:2947–2960. <https://doi.org/10.5194/bg-9-2947-2012>
28. Haroon MF, Hu S, Shi Y, Imelfort M, Keller J, Hugenholtz P, Yuan Z, Tyson GW. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature.* 2013; 500(7464):567–570. DOI: 10.1038/nature12375
29. Hawley ER, Piao H, Scott NM, Malfatti S, Pagani I et al. Metagenomic analysis of microbial consortium from natural crude oil that seeps into the marine ecosystem offshore Southern California. *Stand Genom Sci.* 2014; 9(3):1259–1274. DOI: 10.4056/sigs.5029016



30. Hinkle JE, Mara P, Beaudoin DJ, Edgcomb VP, Teske AP. A PCR-Based Survey of Methane-Cycling Archaea in Methane-Soaked Subsurface Sediments of Guaymas Basin, Gulf of California. *Microorganisms*. 2023; 11(12):2956. DOI: 10.3390/microorganisms11122956.
31. Jaekel U, Musat N, Adam B, Kuypers M, Grundmann O, Musat F. Anaerobic degradation of propane and butane by sulfate-reducing bacteria enriched from marine hydrocarbon cold seeps. *The ISME Journal*. 2013; 7(5):885–895. DOI: 10.1038/ismej.2012.159
32. Jaekel U, Zedelius J, Wilkes H, Musat F. Anaerobic degradation of cyclohexane by sulfate-reducing bacteria from hydrocarbon-contaminated marine sediments. *Front Microbiol*. 2015; 6:116. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00116
33. Jones DS, Flood BE, Bailey JE. Metatranscriptomic insights into polyphosphate metabolism in marine sediments. *ISME J*. 2015; 10:1015–1019. DOI: 10.1038/ismej.2015.169
34. Joye SB, Bowles MW, Samarkin VA, Hunter KS, Niemann H. Biogeochemical signatures and microbial activity of different cold seep habitats along the Gulf of Mexico lower slope. *Deep Sea Res II*. 2010; 57(21-23):1990–2001. DOI:10.1016/j.dsr2.2010.06.001
35. Joye SB, Kleindienst S. Hydrocarbon seep ecosystems. In: *Life in Extreme Environments* Eds Kallmeyer J. DeGruyter Publ., Berlin, 2017:33–52. DOI:10.1515/9783110493672-002
36. Joye SB. The Geology and Biogeochemistry of Hydrocarbon Seeps. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 2020; 48:205-231. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-063016-020052>
37. Kappler A, Bryce C. Cryptic biogeochemical cycles: unraveling hidden redox reactions. *Environ. Microbiol*. 2017; 19(3):842–46. DOI:10.1111/1462-2920.13687
38. Kennicutt MC. Oil and gas seeps in the Gulf of Mexico. In: *Habitats and Biota of the Gulf of Mexico: Before the Deepwater Horizon Oil Spill* Eds C Ward. New York: Springer, 2017:275–358. DOI:10.1007/978-1-4939-3447-8_5
39. Knittel K, Lösekann T, Boetius A, Kort R, Amann R. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(1):467–479. DOI: 10.1128/AEM.71.1.467-479.2005
40. Knittel K, Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu Rev Microbiol*. 2009; 63:311–334. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093130
41. Kramer KV, Shedd WW. A 1.4-billion-pixel map of the Gulf of Mexico seafloor. *EOS Trans AGU*. 2017; 98(8):101029. DOI:10.1029/2017EO073557
42. Kurth JM, Huub JM, den Camp O, Welte CU. Several ways one goal—methanogenesis from unconventional substrates. *Appl Microbiol and Biotech*. 2020; 104:6839–6854 <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10724-7>
43. Liang L, Wang Y, Sivan O, Wang F. Metal-dependent anaerobic methane oxidation in marine sediment: Insights from marine settings and other systems. *Sci China Life Sci*. 2019;62(10):1287-1295. DOI: 10.1007/s11427-018-9554-5.
44. Litchschlag A, Felden J, Bruchert V, Boetius A, de Beer D. Geochemical processes and chemosynthetic primary production in different thiotrophic mats of the



- Håkon Mosby Mud Volcano (Barents Sea). *Limnol Oceanogr.* 2010; 55(2):931–949. DOI:10.4319/lo.2010.55.2.0931
45. Lyu Z, Shao N, Akinyemi T, Whitman WB. Methanogenesis. *Curr Biol.* 2018;28(13):R727-R732. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.021.
 46. Marlow JJ, Steele JA, Ziebis W, Thurber AR, Levin LA, Orphan VJ. Carbonate-hosted methanotrophy represents an unrecognized methane sink in the deep sea. *Nat Commun.* 2014; 5:5094. DOI:10.1038/ncomms6094
 47. Miyazaki J, Higa R, Toki T, Ashi J, Tsunogai U et al. Molecular characterization of potential nitrogen fixation by anaerobic methane-oxidizing archaea in the methane seep sediments at the number 8 Kumano Knoll in the Kumano Basin, offshore of Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(22):7153–62. DOI: 10.1128/AEM.01184-09
 48. Nie WB, Ding J, Xie GJ, Tan X, Lu Y, Peng L, Liu BF, Xing DF, Yuan Z, Ren N. Simultaneous nitrate and sulfate dependent anaerobic oxidation of methane linking carbon, nitrogen and sulfur cycles. *Water Res.* 2021; 194:116928. DOI: 10.1016/j.watres.2021.116928.
 49. Niemann H, Losekann T, de Beer D, Elvert M, Nadalig T, Knittel K, Amann R, Sauter EJ, Schluter M, Klages M, Foucher JP, Boetius A. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature.* 2006; 443(7113):854–858. DOI:10.1038/nature05227
 50. Novikova SA, Shnyukov YF, Sokol EV, Kozmenko OA, Semenova DV, Kutny VA. A methane-derived carbonate build-up at a cold seep on the Crimean slope, north-western Black Sea. *Mar Geol.* 2015; 363(2):160–173. DOI:10.1016/j.mar-geo.2015.02.008
 51. Orcutt BN, Joye SB, Kleindienst S, Knittel K, Ramette A, Reitz A, Samarkin V, Treude T, Boetius A. Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Deep Sea Res Part II: Top Stud Oceanogr.* 2010; 57(21-23):2008–2021. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2010.05.014>
 52. Orcutt BN, Lapham LL, Delaney J, Sarode N, Marshall KS et al. Microbial response to oil enrichment in Gulf of Mexico sediment measured using a novel long-term benthic lander system. *Elem Sci Anthr.* 2017; 5(3):18. DOI:10.1525/elementa.129
 53. Pohlman JW, Bauer JE, Waite WF, Osburn CL, Chapman NR. Methane hydrate-bearing seeps as a source of aged dissolved organic carbon to the oceans. *Nat Geosci.* 2011; 4:37–41. <https://doi.org/10.1038/ngeo1016>
 54. Ristova PP, Wenzhofer F, Ramette A, Felden J, Boetius A. Spatial scales of bacterial community diversity at cold seeps (Eastern Mediterranean Sea). *ISME J.* 2014; 9(6):1306–1318. DOI: 10.1038/ismej.2014.217
 55. Roberts HH, Hardage BA, Shedd WW, Hunt J Jr. Seafloor reflectivity – an important seismic property for interpreting fluid/gas expulsion geology and the presence of gas hydrate. *Lead Edge.* 2006; 25(5):620–628. DOI:10.1190/1.2202667
 56. Ruff SE, Biddle JF, Teske AP, Knittel K, Boetius A, Ramette A. Global dispersion and local diversification of the methane seep microbiome. *PNAS.* 2015; 112(13):4015–4020. DOI:10.1073/pnas.1421865112



57. Ruff SE, Felden J, Gruber-Vodicka HR, Marcon Y, Knittel K et al. In situ development of a methanotrophic microbiome in deep-sea sediments. *ISME J.* 2018; 13(1):197–213. DOI:10.1038/s41396-018-0263-1
58. Scheller S, Goenrich M, Boecher R, Thauer RK, Jaun B. The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane. *Nature.* 2010; 465(7298):606–608. DOI: 10.1038/nature09015
59. Semler AC, Fortney JL, Fulweiler RW, Dekas AE. Cold Seeps on the Passive Northern U.S. Atlantic Margin Host Globally Representative Members of the Seep Microbiome with Locally Dominant Strains of Archaea. *Appl Environ Microbiol.* 2022; 88(11):e0046822. doi: 10.1128/aem.00468-22.
60. Singh R, Guzman MS, Bose A. Anaerobic oxidation of ethane, propane, and butane by marine microbes: a mini review. *Front Microbiol.* 2017; 8:2056. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02056>
61. Suess E. Marine cold seeps and their manifestations: geological control, biogeochemical criteria and environmental conditions. *Int J Earth Sci.* 2014; 103:1889–1916. <https://doi.org/10.1007/s00531-014-1010-0>
62. Treude T, Knittel K, Blumenberg M, Seifert R, Boetius A. Subsurface microbial methanotrophic mats in the Black Sea. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(10):6375–6378. doi: 10.1128/AEM.71.10.6375-6378.2005
63. Vallino J, Algar CK. The thermodynamics of marine biogeochemical cycles: Lotka revisited. *Annu Rev Mar Sci.* 2016; 8:333–356. DOI: 10.1146/annurev-marine-010814-015843
64. Vigneron A, Alsop EB, Cruaud P, Pilibert G, King B et al. Comparative metagenomics of hydrocarbon and methane seeps of the Gulf of Mexico. *Sci Rep.* 2017; 7(1):16015. DOI: 10.1038/s41598-017-16375-5
65. Vigneron A, L'Haridon S, Godfroy A, Roussel EG, Cragg BA et al. Evidence of active methanogen communities in shallow sediments of the Sonora Margin cold seeps. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81(10):3451–59. DOI: 10.1128/AEM.00147-15
66. Wang Y, Wegener G, Hou J, Wang F, Xiao X. Expanding anaerobic alkane metabolism in the domain of Archaea. *Nat Microbiol.* 2019; 4(4):595–602. DOI: 10.1038/s41564-019-0364-2
67. Xin Y, Wu N, Sun Z, Wang H, Chen Y, Xu C, Geng W, Cao H, Zhang X, Zhai B, Yan D. Methane seepage intensity distinguish microbial communities in sediments at the Mid-Okinawa Trough. *Sci Total Environ.* 2022; 851(2):158213. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158213.
68. Yin X, Zhou G, Wang H, Han D, Maeke M, Richter-Heitmann T, Wunder LC, Aromokeye DA, Zhu QZ, Nimzyk R, Elvert M, Friedrich MW. Unexpected carbon utilization activity of sulfate-reducing microorganisms in temperate and permanently cold marine sediments. *ISME J.* 2024; 18(1):wrad014. DOI: 10.1093/ismejo/wrad014.
69. Zhao R., Summers Z.M., Christman G.D., Yoshimura K.M., Biddle J.F. Metagenomic views of microbial dynamics influenced by hydrocarbon seepage in sediments of the Gulf of Mexico. *Scientific Reports.* 2020; 10:5772 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62840-z>



70. Zhuang G-C, Montgomery A, Sibert RJ, Rogener M-K, Samarkin VA, Joye SB. Effects of pressure, methane concentration, sulfate reduction activity, and temperature on methane production in surface sediments of the Gulf of Mexico. *Limnol Oceanogr.* 2018; 63(5):2080–2092. DOI:10.1002/lno.10925

Стаття надійшла до редакції 21.08.2024 р.



УДК 579.6:606+631/635

М. Б. Галкін, І. В. Страшнова, А. В. Андрющенко

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: kgalkin@onu.edu.ua

ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У БІОРЕМЕДІАЦІЇ ҐРУНТІВ, ЗАБРУДНЕНИХ ВНАСЛІДОК БОЙОВИХ ДІЙ

*Внаслідок бойових дій у ґрунти потрапляють речовини з вибухівки та механізмів вогнепальної зброї, паливно-мастильні матеріали і важкі метали, які несуть згубний вплив на екосистеми. У статті проаналізовано основні способи біоремедіації такого ґрунту. Використання шламових реакторів, земельної обробки, компостування, біостимуляції, біозбагачення та імобілізованих мікроорганізмів дозволяє позбутися до 99% токсичних речовин за рахунок природної або привнесеної мікробіоти. Термін очищення коливається від декількох тижнів до декількох років залежно від способу ремедіації, кліматичних умов та рівня забруднення. Перспективними є використання комбінованих методів. Очищення здійснюється за різними механізмами, які полягають у повному або частковому розщепленні речовин з трансформацією їх у нетоксичні форми (вибухівка, нафтопродукти), біоаккумуляції, біосорбції, біопреципітації та біовідновленні (важкі метали). У біоремедіації беруть участь як аеробні, так і анаеробні мікроорганізми, і найчастіше у літературі описано застосування представників таких родів як *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Cellulomonas* та інших. Необхідним є подальший пошук штамів, здатних до одночасного очищення ґрунту від декількох типів забруднювачів.*

Ключові слова: забруднення ґрунту внаслідок бойових дій, біоремедіація, аеробні та анаеробні деструктори, виведення важких металів з ґрунту.

Бойові дії несуть згубний вплив для усіх мешканців екосистем і призводять до катастрофічного погіршення стану ґрунтів, води та повітря [4, 22]. Первинний вплив полягає в наслідках обстрілів та вибухів – пожежах та вибухових хвилях, а довготривалий – у накопиченні у навколишньому середовищі токсичних викидів, важких металів, нафтопродуктів, вибухівки і продуктів згоряння [76, 86]. Окремою проблемою постає руйнування екологічно небезпечних виробництв – коксохімічних, нафтопереробних заводів та ін. [5].

Згідно з даними Державної екологічної інспекції України, площа забруднених ґрунтів внаслідок збройної агресії РФ на третю декаду 2024 року сягнула 859,3 тис. м², а площа засмічених земель – 19,8 млн. м², що склало загальні збитки на 16,5 млрд і 1,12 трлн гривень відповідно [3].

© М. Б. Галкін, І. В. Страшнова, А. В. Андрющенко, 2024



Сільськогосподарські угіддя займають близько 69% території України. Надією у відновленні ґрунтів та оздоровленні екосистем, постраждалих внаслідок бойових дій, постає застосування методів біоремедіації та відновлювального землеробства [40].

Сучасні досягнення біотехнології дозволяють відновити родючість агроценозів з використанням представників корисної мікробіоти. Мікроорганізми застосовують як агенти біодеструкції, які розщеплюють повністю або частково токсичні речовини у ґрунті, або ж трансформують їх у безпечні форми [8, 44]. Одним напрямком є створення бактеріальних біосенсорів для виявлення мін, зокрема – тринітро- та динітротолуенових на основі штамів *Escherichia coli* з репортерними генами, які забезпечують біолюмінесценцію за присутності боеприпасів у ґрунті [85].

Метою даного огляду був аналіз даних літератури щодо можливостей біоремедіації ґрунтів, постраждалих від бойових дій.

До завдань літературного аналізу входили коротке викладення основних методів біоремедіації з використанням мікроорганізмів, їх порівняння та перспективи застосування в очищенні ґрунтів та відновленні їх родючості.

1. Забруднення ґрунтів внаслідок бойових дій

У районах бойових дій ґрунт забруднюється внаслідок вибухів та обстрілів. В основі вибухівки та у механізмах вогнепальної зброї використовується гексагідро-1,3,5-тринітро-1,3,5-тріазин (“Royal Demolition Explosive”, RDX), 2,4,6-тринітротолуол (TNT), октагідро-1,3,5,7-тетранітро-1,3,5,7-тетразоцин (“High Melting Explosive”, HMX), нітрогліцерин (NG), нітроцелюлоза (NC), нітрогуанідин, перхлорат, 1,3,5-тринітробензен, динітробензен, 2,4,6-тринітрофенол, 2,4-динітротолуен (DNT), N-метил-N,2,4,6-тетранітроанілін (тетрил) [40, 73]. Найбільш часто уживані – RDX та TNT, є потенційними канцерогенами, спричиняють конвульсії, хвороби печінки та анемію. Перхлорати заважають нормальному потраплянню йоду у клітини щитоподібної залози, а довготривалий вплив NG може спричинити ціаноз, галюцинації та висипи [73].

У ґрунті, забрудненому нітроароматичними сполуками, виживають мікроорганізми, найбільш пристосовані до даних умов. Змінюється видовий склад мікробіоти. Так, 26% зразків ДНК, виділених з таких ділянок, належали представникам *Acidobacteria* [26, 38]. Частка представників родини *Burkholderiaceae* у неораному ґрунті, забрудненому TNT, складала 79,7%, а у зораному ґрунті превалювали *Alcaligenaceae* – 54,7% від усіх зразків виділеної ДНК [45].

Ґрунти також забруднюються внаслідок розливу паливно-мастильних сумішей [34] та потрапляння важких металів зі зброї та використаних боеприпасів у навколишнє середовище [76, 86]. Оцінка впливу важких металів та нафтопродуктів на ріст паростків вівса у концентраціях, притаманних ґрунтам у районах бойових дій, показала найбільшу фітотоксичність саме нафтопродуктів, присутність яких не дозволяє рослинам отримувати необхідну кількість вологи [6].



Негативний вплив важких металів на ріст і розвиток рослин, зокрема – пшениці, проявляється у зменшенні маси рослин, кількості зерен у колосі та їх середній масі, що було показано у випадку цинку та купруму [7]. Підвищена концентрація цинку зменшувала кількість вологи у рослинах [6].

Важкі метали потрапляють у ґрунти, в тому числі – призначені для сільськогосподарської діяльності, внаслідок застосування артилерійської зброї [1]. Так, дослідження ґрунту Бучанського району Київської області через рік після ведення бойових дій показало підвищення концентрації важких металів (цинку, плюмбуму, хрому, нікелю, купруму, кадмію) у 3–9 разів. Причому високий рівень забруднення спостерігався не тільки у вирвах після обстрілів, а й на відстані 30 м від них внаслідок розсіювання через вибухові хвилі [1].

У ґрунтах Сумського та Охтирського району Сумської області, забруднених внаслідок падіння авіабомб та руйнації техніки, у 2022 році фонові концентрації плюмбуму була перевищена у 5,4, цинку – у 3,9, купруму – у 4,6, кадмію – у 1,4, мангану – у 4,8, кадмію – у 1,4, нікелю – у 1,2 рази [2].

Концентрація титану у вирві від снаряду перевищувала фонову у 150 разів. Також було зафіксовано появу ванадію, який у контрольних ділянках ґрунту був відсутній. На окремій ділянці було виявлено перевищення концентрації стронцію [5].

Гострою проблемою постає накопичення важких металів у рослинах. Так, на паростках вівса було показано, що за перевищення концентрації плюмбуму у ґрунті у 2–10 разів від допустимої, його вміст у рослинах збільшується на 20% – 150% відповідно [6].

2. Методи біоремедіації ґрунту, забрудненого у результаті бойових дій

В очищенні ґрунтів від вибухових речовин, паливно-мастильних матеріалів і важких металів використовують методи шламового реактору, земельної обробки, біостимуляції, компостування та біозбагачення, включаючи варіанти з імобілізацією мікроорганізмів [16, 27, 35, 57, 67, 91]. Так, прикладом успішно проведеної біоремедіації, описаним у літературі, було очищення ґрунту збройного заводу від вибухових речовин. Для цього було застосовано два методи біоремедіації, а саме **методи шламового реактору (“soil slurry reactor”)** і **метод земельної обробки (“land farming technique”)** [44].

2.1. Шламовий реактор або реактор на основі змішаних суспензій застосовується у біоремедіації для очищення забрудненого ґрунту або відходів. У цьому методі забруднений ґрунт змішується з водою та іноді іншими добавками (поживними речовинами, сурфактантами) для створення суспензії – густої суміші. Цю суспензію потім поміщають у реактор, де вона постійно перемішується і аерується для оптимізації умов для мікроорганізмів, які розкладають забруднювачі [35, 74, 91].

Ключові характеристики шламового реактора включають:

1. Перемішування: ґрунт і вода ретельно перемішуються, щоб забезпечити рівномірний розподіл забруднювачів і мікроорганізмів у суспензії.
2. Аерація: повітря або кисень часто вводять у реактор для стимулювання росту аеробних мікроорганізмів, які ефективно розкладають органічні забруднювачі.



3. Контроль: умови в реакторі, такі як температура, рівень рН і рівень поживних речовин, можна контролювати для оптимізації процесу біодеструкції.

Шламкові реактори особливо ефективні для обробки ґрунтів із високою концентрацією забруднювачів, які складно розкладаються у природніх умовах, або для типів ґрунтів, які важко очищати іншими методами. Їх можна використовувати для ремедіації широкого спектра органічних забруднювачів, включаючи нафтопродукти, пестициди та промислові хімікати [35, 74, 80].

2.2. Земельна обробка – це метод біоремедіації, який використовується для очищення забрудненого ґрунту шляхом підвищення природного мікробного розкладання забруднювачів. Він передбачає розподіл забрудненого ґрунту на великій, рівній поверхні (зазвичай на відкритому полі) та періодичне розпушування для аерації ґрунту та стимулювання мікробної активності [57, 80, 94].

Метод передбачає наступні етапи:

1. Підготовка ґрунту: забруднений ґрунт видобувається та транспортується на ділянку для обробки, яка часто підстиляється непроникним бар'єром, щоб запобігти проникненню забруднювачів у ґрунтові води.

2. Розподіл ґрунту: забруднений ґрунт розподіляється тонкими шарами на підготовленій поверхні. Це забезпечує краще проникнення повітря у випадку використання деструктивних аеробних процесів.

3. Розпушування або аерація: ґрунт регулярно розпушується або механічно аерується для покращення проникнення кисню, що підвищує активність аеробних мікроорганізмів.

4. Моніторинг і контроль: протягом усього процесу характеристики ґрунту, такі як вологість, рН, рівень поживних речовин і температура, контролюються та коригуються для оптимізації мікробної активності. У деяких випадках можуть бути додані поживні речовини або додаткові мікроорганізми для прискорення процесу розкладання.

5. Завершення та відновлення: після того як забруднювачі будуть розкладені на менш шкідливі речовини, оброблений ґрунт можна залишити на місці або перенести для використання на іншій ділянці [16, 23, 80].

Звичайною практикою очищення ґрунту, забрудненого вибухівкою, є використання **методів біостимуляції** та **біозбагачення**, які були застосовано, наприклад, для деструкції RDX [46] та DNT [9].

2.3. Біостимуляція – це метод біоремедіації, що передбачає покращення умов для природного росту та активності мікроорганізмів-деструкторів. Цей метод постає у додаванні певних речовин до забрудненого середовища для стимулювання природного мікробного розкладу [16, 19, 80].

Основні етапи біостимуляції:

1. Оцінка умов: перш ніж почати, оцінюють умови в забрудненому середовищі (ґрунт, вода, повітря) та визначають, які чинники обмежують діяльність мікроорганізмів (наприклад, нестача поживних речовин, низький рівень кисню).

2. Додавання поживних речовин: для стимулювання росту мікроорганізмів додають поживні речовини, які містять нітроген, фосфор або інші



елементи, в тому числі – органіку, необхідні для їхнього росту. Наприклад, для збільшення ефективності деструкції нафти методом земельної обробки у ґрунт вносили стебла бавовни [94].

3. Аерація: вводять кисень або повітря для підтримки метаболізму мікроорганізмів, якщо використовують деструктори-аероби.

4. Контроль умов: моніторинг і регулювання температури, рН та інших чинників, щоб забезпечити оптимальні умови для мікробної активності [10, 16].

Описане на початку розділу очищення ґрунту збройного заводу від вибухових речовин, присутніх у концентраціях 4000–10000 мг/кг для TNT, 800–1900 мг/кг для RDX і 600–900 мг/кг для HMX, показало більшу ефективність шламового реактору. Метод поєднували з біостимуляцією, що полягала у додаванні меляси як додаткового джерела карбону [44]. На 182-й день 99% TNT у ґрунті більше не виявлялося, причому 23% було переведено у CO₂, 24% використано для побудування клітинних структур, а решта була трансформована у низку похідних, в тому числі – 4-метил-3,5-динітроанілін, 2-метил-3,5-динітроанілін, 6-метил-5-нітробензен-1,3-діамін, жирні кислоти, а також неідентифіковані метаболіти. Деструкція RDX і HMX не виявилася настільки ефективною через складнішу структуру цих молекул. Кількість мікроорганізмів у реакторі зростала від 81 x 10² колонієутворювальних одиниць на см³ (КУО/см³) до 121 x 10⁶ КУО/см³ за 182 дні біоремедіації. Використання методу земельної обробки сприяло деструкції 82% TNT у ґрунті, і майже не змінювало вмісту RDX і HMX [44].

2.4. Компостування сприяло очищенню ґрунту від TNT, RDX та HMX до недектованого рівня впродовж 10–12 днів [27, 65, 93].

Компостування – це процес розкладання мікроорганізмами відходів і забруднювачів, змішаних з органікою. У контексті біоремедіації компостування використовується для розкладу та трансформації органічних забруднювачів, таких як нафтопродукти, пестициди та інше органічне сміття, до менш шкідливих або безпечних речовин [65]. У певному сенсі компостування відноситься до методу біостимуляції.

Етапи компостування:

1. Вибір сировини і змішування: компостування починається з вибору органічних матеріалів, які можуть включати забруднений ґрунт, сільськогосподарські відходи, харчові відходи або інші органічні матеріали. Матеріали змішуються, щоб забезпечити збалансований склад [71].

2. Процес компостування: мікроорганізми розкладають забруднювачі, перетворюючи їх у менш токсичні речовини. Формування гумусоподібного продукту може тривати кілька тижнів або місяців, залежно від умов та типу сировини.

3. Контроль: підтримується адекватний рівень вологості для підтримки мікробної активності. Температура компосту повинна сягати 55–65°C.

4. Використання: готовий компост може бути використаний як добриво або для відновлення забрудненої землі [65].

Аеробне компостування з внесенням забрудненого ґрунту (30% від суміші), 21% коров'ячого посліду, 18% деревної тирси, 18% зеленої маси люцерни, 10% картопляних відходів та 3% курячого посліду дозволило зменши-



ти концентрацію вибухівки до недектованого рівня [65, 93]. Анаеробне компостування сприяло біодеструкції 94% RDX за 26 тижнів, але даний метод був ефективним лише за середнього рівня забруднення. При цьому у суміш з ґрунтом додавали Fe(0) (0,5%) та 2% комерційного продукту «Дараменд», призначеного для покращення процесу компостування [33].

Результати очищення ґрунту від вибухівки та важких металів компостуванням представлені у літературі лише невеличкою кількістю робіт [27, 33, 79, 93], натомість даний метод частіше застосовується для біоремедіації ділянок, забруднених нафтопродуктами [52, 53, 58]. Так, внесення коров'ячого, курячого посліду та каналізаційного осаду сприяло ремедіації ґрунту від нафти на 67%, 79% та 62% відповідно протягом 35 днів [58]. Компостування з харчовими відходами сприяло деструкції 90–92% дизелю у ґрунті [53].

2.5. Біозбагачення – це метод біоремедіації, при якому у забруднене середовище додають певні штами мікроорганізмів, здатні розкласти забруднювачі [16, 64, 80].

Основні етапи біозбагачення:

1. Вибір мікроорганізмів: відбирають мікроорганізми або їх штами, які мають здатність до розкладання конкретних забруднювачів, присутніх у середовищі.

2. Підготовка і внесення: відібрані мікроорганізми у вигляді моно- або змішаних культур додають у забруднене середовище.

3. Моніторинг: контролюють їх виживання, розмноження та активність у середовищі. Перевіряють, чи мікроорганізми ефективно розкладають забруднювачі [16, 64].

2.6. Біозбагачення мікроорганізмами, імобілізованими на носіях

Імобілізація мікроорганізмів полягає у прикріпленні або фіксації мікроорганізмів на твердих або гелевих носіях. Цей підхід дозволяє підвищити ефективність розкладу забруднювачів, зокрема в складних екологічних умовах, де мікроорганізми, що вільно існують, можуть мати обмежену активність або виживаність [67, 72, 81].

Етапи імобілізації мікроорганізмів:

1. Вибір мікроорганізмів і носія: мікроорганізми підбираються відповідно до типу забруднювача. Носії включають глини, пісок, целюлозу, деревну тирсу, вулканічний камінь або інші природні матеріали. Штучні носії включають синтетичні полімери, активоване вугілля, біопластики або інші матеріали, які можуть бути спеціально створені для забезпечення кращого прикріплення мікроорганізмів та підтримки їх активності [49, 97].

2. Методи імобілізації:

- Адсорбція: мікроорганізми природним чином прикріплюються до поверхні носія за рахунок фізико-хімічних взаємодій, таких як гідрофобні зв'язки або електростатичні сили [72].

- Коагуляція і флокуляція: використовуються хімічні речовини, які викликають агрегацію мікроорганізмів і їх прикріплення до носія.

- Інкапсуляція: мікроорганізми захоплюються всередині матриці (наприклад, у гелі, альгінаті або полімері), що утримує їх на місці та захищає від несприятливих умов середовища.



- Ковалентне зв'язування: мікроорганізми хімічно зв'язуються з носієм через ковалентні зв'язки, що забезпечує їх стійке прикріплення.

3. Внесення у середовище, яке потребує очищення: іммобілізовані мікроорганізми легко вводяться в системи очищення ґрунту, і їх легше контролювати порівняно з культурами, що вільно існують [97].

Іммобілізовані мікроорганізми краще витримують несприятливі умови навколишнього середовища, такі як зміни температури, рН або наявність токсичних речовин, і підтримують високу метаболічну активність мікроорганізмів протягом тривалого часу [59, 67, 78]. Так, бактерії *Arthrobacter subterraneus*, іммобілізовані на частках біовугілля, виживали до 6 місяців і здійснювали біодеструкцію 85,98% RDX і 80,4% HMX у забрудненому ґрунті за 30 днів [84].

Якщо порівнювати вищезазначені методи, можна зауважити, що біостимуляція шляхом додавання поживних речовин або джерел карбону показувала високу ефективність у поєднанні з іншими методами, такими як шламовий реактор або земельна обробка [44]. Компостування є ефективним підходом для швидкого очищення ґрунту від органічних забруднювачів і вибухових речовин, але може бути менш ефективним для важких металів та інших неорганічних забруднювачів [52, 58]. Метод шламового реактору можна рекомендувати для ґрунтів із високою концентрацією забруднювачів, що важко розкладаються у природних умовах [35, 74]. Метод земельної обробки краще підходить для очищення від легко розкладних органічних речовин і підвищує ефективність мікробної активності завдяки природній аерації [94]. Біозбагачення з іммобілізацією мікроорганізмів дозволяє значно підвищити ефективність біоремедіації завдяки введенню спеціально відібраних штамів мікроорганізмів [67, 72, 84]. Для очищення певних ділянок ґрунту доцільним може бути поєднання декількох вищезазначених методів.

3. Мікроорганізми, здатні до деструкції вибухових речовин

Мікроорганізми здатні виживати у забруднених ґрунтах і пристосовуватися до деструкції вибухових речовин. Так, серед бактерій в анаеробних умовах повну або часткову біодеградацію TNT здійснюють *Clostridium* sp. [12] і *Desulfovibrio* sp. [31], *Escherichia coli*, *Methanococcus* sp., *Veillonella alcalescens* [82, 83].

За аеробних умов цей процес відбувається за участю *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus erythropolis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Methylobacterium* sp., *Serratia marcescens*, *Sporolactobacillus kafiensis* [83], *Serratia plymuthica* [31]. Так, дослідниками було показано зменшення концентрації TNT в лабораторних умовах на 46% і 59% за внесення культури *Pseudomonas aeruginosa* і первинних концентрацій забруднювача 50 мг/л і 75 мг/л [60].

Мінералізувати і трансформувати TNT здатні також деякі базидіо- та мікроміцети, наприклад, *Trametes modesta*, *Agrocybe praecox*, *Alternaria* sp., *Aspergillus terreus*, *Mucor mucedo*, *Penicillium* sp. [44, 68, 73].

Біодеградація RDX краще відбувається за анаеробних умов або умов зменшеної концентрації кисню, і може здійснюватися такими бактеріями,



як *Clostridium bifermentans*, *Morganella morganii*, *S. marcescens*, *Prevotella ruminicola*, *Anaerovibrio lipolyticus* [21, 32, 39, 46, 73]. Консорціум, що складався переважно з представників родів *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* успішно здійснювали біодеградацію RDX за додавання у середовище крохмалю в концентрації 2,5 г/л з високою швидкістю деградації 0,015 мМ на день [46]. Крохмаль додається не тільки для покращення росту певних груп мікроорганізмів, але й для підсилення відновлювального потенціалу середовища для здійснення нітрат-редукції [46].

За аеробних умов біодеградацію RDX здійснюють представники *Actinobacteria*, і вперше цю властивість було описано для *Corynebacterium* [73]. Нещодавно дослідниками було показано, що представники роду *Actinomyces*, виділені з ділянок, забруднених вибуховими речовинами, здатні здійснювати біодеструкцію не тільки RDX, а й TNT [41].

Біодеградація NG відбувається за аеробних і анаеробних умов, і краще – за присутності джерела карбону. До такого процесу здатні багато бактерій – представників родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Rhodococcus*, *Klebsiella*, а також мікроміцети [55, 73, 90].

Здатність до деградації перхлоратів відома для бактерій роду *Citrobacter* [69].

Біодеградацію TNT і RDX було показано для штамів мікроміцетів *Phanerochaete chrysosporium*, виділених з ґрунту військового полігону. Серед бактерій потенційними агентами біоремедіації, виділеними з цих ділянок, були *Bacillus sp.* (в тому числі – *B. subtilis*), *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella pneumonia* [70].

Було показано посилення трансформації DNT природними консорціумами мікроорганізмів на 82% за внесення комерційних сполук сульфуру та фосфору. При цьому у природних популяціях збільшувалася частка представників родів *Burkholderia*, *Rhodanobacter*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, завдяки яким більшою мірою й здійснювався біоремедіаційний процес [9].

Штам *Planomicrobium flavidum*, виділений з ґрунтів, забруднених вибухівкою, розкладав 70% НМХ за 20 днів [66].

Незважаючи на досліджений потенціал багатьох мікроорганізмів, саме бактерії роду *Pseudomonas* є найбільш широко представленими як агенти біодеструкції вибухових речовин – ймовірно, за рахунок нескладних умов культивування даних мікроорганізмів, а також їх пристосованості до багатьох умов навколишнього середовища [26, 55]. Для успішної ремедіації забруднених ґрунтів має бути дослідженим потенціал інших мікроорганізмів з наголосом на використання консорціумів.

4. Мікроорганізми, здатні до деструкції паливно-мастильних матеріалів

Ґрунт авіабази у Польщі, забруднений керосином та важкими фракціями дизельного палива, було успішно очищено у шламових реакторах з використанням природної мікробіоти даних ґрунтових ділянок. Було звільнено 90% ґрунту від домішок палива за декілька місяців [48].



Порівняння результатів біостимуляції з додаванням азотних, калійних та фосфорних добрив, та природного очищення у ґрунті ділянок військових полігонів, розташованих в Альпах, Південний Тіроль, Італія, показало більш ефективне очищення від паливно-мастильних матеріалів за внесення добрив і підвищення температури до 20 °С [87]. Під час біоремедіації спостерігалися зміни у природній популяції мікроорганізмів. Так, разом з тим, як вміст палива у ґрунті зменшувався, склад мікробіоти ставав усе більше гомогенним. При цьому збільшувалися частки представників *Gammaproteobacteria* та *Bacteroidetes*, серед них найбільшою мірою – *Pseudomonas* sp. [25, 29, 87] як типовий приклад так званого «гама-шифту», який спостерігається на субстратах, забруднених нафтою та похідними паливними матеріалами [30, 87]. Крім псевдомонад, у даному дослідженні превалювали такі представники *Gammaproteobacteria*, як *Lysobacter*, *Poalibacter*, *Solimonas*, *Pseudoxanthomonas*, та представники *Bacteroidetes* – *Mangrovibacterium*, *Paludibacter*, *Petrimonas*, *Mariniphaga* [87].

У забруднених паливом ґрунтах було відмічено дуже низьку кількість архей порівняно з неконтамінованими [87]. Представники *Archae* (*Methanosaeta*, *Methanoculleus*, *Methanolinea*), які можуть складати 45–50% видового складу метаногенних співтовариств у субстратах з великим вмістом гексадеканів та октадеканів, відіграють суттєву роль в очищенні ґрунту від нафти лише за анаеробних умов [36].

Також за анаеробних умов найактивнішими деструкторами нафти і похідних сполук виступали представники роду *Clostridium*, які складали 30,4% від видового складу мікробних популяцій на субстратах з нафтою, 42–43% на субстратах з гексадеканами і октадеканами, 52,1% – за наявності пальмітату, і 60,4% – на субстратах, забруднених стеаратами [36].

Біоремедіація ґрунту військового полігону північної Гренландії, забрудненого дизелем, показала, що у холодному кліматі було можливим позбавитися 64% дизелю за перший рік експерименту методом земельної обробки та біостимуляції азотними, калійними та фосфорними добривами з домішками мікроелементів. При цьому популяція мікроорганізмів-деструкторів збільшувалася до $1,2 \times 10^9$ КУО/г ґрунту. Залишалися у ґрунті ще протягом 5 років 18% стійких фракцій дизелю [42].

У ґрунтах, забруднених дизелем, підтримуються значні популяції ліполітичних та фосфат-солубілізуювальних бактерій, як це було показано для ділянок у Мексиці. Загальна кількість мікроорганізмів у забруднених ґрунтах на 24–58% була нижчою за таку на контрольних ділянках, але серед них виділялися активні деструктори дизелю – такі як *S. marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Raoultella ornithinolytica*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas ravanii*, виділені дослідниками та відібрані за здатністю до продукування сурфактантів та відповідного емульгування дизелю з наступною його деструкцією. Найкращі показники демонстрував штаб *S. marcescens*, рівень емульгування дизелю яким складав 74,2%, що сприяло деструкції 96% палива. Консорціум з шести штамів вищезгаданих видів здійснював біодеградацію 97% дизелю [62].



За деструкцію нафти у піщаному ґрунті були відповідальні *Nocardioides*, *Dietzia* (особливо *D. papillomatosis*), *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Gordonia* [15]. Бактерії штаму *Burkholderia cepacia*, виділені з контамінованого ґрунту, були здатними до деструкції 80% нафтових вуглеводнів [13].

Представники роду *Bacillus* були здатними до ефективної деструкції дизелю – *B. subtilis* [29, 43] та нафти – *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* [25, 37].

5. Мікроорганізми, здатні до біоремедіації ґрунтів, забруднених важкими металами

Біоремедіація ґрунтів, забруднених важкими металами, базується на здатності деяких мікроорганізмів поглинати, осаджувати чи відновлювати важкі метали, що дозволяє знижувати їх концентрацію в ґрунті до безпечного рівня. Основні механізми біоремедіації включають **біоаккумуляцію**, **біосорбцію**, **біопреципітацію** та **біовідновлення** [8, 11, 56, 79].

За процесу **біоаккумуляції** мікроорганізми поглинають важкі метали з ґрунту та накопичують їх всередині своїх клітин. Наприклад, бактерії роду *Bacillus* – а саме, представники видів *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. aryabhattai* здатні поглинати кадмій, плумбум, цинк, арсен, хром [20, 63, 88, 95]. *B. licheniformis* активно акумулювали купрум [11].

Бактерії *P. aeruginosa* і *Cupriavidus taiwanensis*, виділені з цинкових шахт, здійснювали біоаккумуляцію кадмію та цинку [51]. *Exiguobacterium* sp. були здатними до сорбції та акумуляції кадмію, нікелю, купруму та цинку [14].

Процес **біосорбції** відбувається завдяки тому, що метали зв'язуються з клітинними стінками або зовнішніми полімерами мікроорганізмів, що зменшує їхню рухливість і токсичність у ґрунті. Наприклад, *B. thuringiensis*, *B. cereus* здатні адсорбувати кадмій, нікель, хром, купрум, плумбум, цинк, гідраргірум [17, 89, 95]. *B. pumilis* і *B. subtilis*, стійкі до підвищених концентрацій купруму, здійснювали біосорбцію Cu^{2+} [28].

Описано здатність до сорбції Cr(VI) у штаму *Shewanella putrefaciens* [77]. Бактерії штаму *Pseudodescherichia vulneris*, виділеного із забрудненого кадмієм ґрунту і надзвичайно стійкі до впливу цього металу, були здатними до сорбції 71% кадмію [92].

Біосорбцію 71% плумбуму було здійснено консорціумом штамів *Pseudomonas stutzeri* та *Cupriavidus metallidurans* [75].

Біопреципітація полягає в тому, що деякі мікроорганізми можуть перетворювати розчинні йони важких металів у нерозчинні форми, які осаджуються і залишаються в ґрунті в стабільному стані. Наприклад, окремі штами *B. thuringiensis* здатні преципітувати плумбум у фосфат плумбуму $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$ [24]. Штам *Rahnella* sp. здійснював преципітацію купруму у присутності кальцію у мінеральну фосфатну форму $\text{CuCa}_{10}(\text{PO}_4)_7$, а плумбум у присутності кальцію – у фосфати $\text{Pb}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ і $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ [50].

Sporosarcina pasteurii, відомі за здатністю преципітувати Ca^{2+} у CaCO_3 , можуть також іммобілізувати важкі метали, наприклад, цинк, кадмій і плум-



бум, здійснюючи їх преципітацію у відповідні карбонати, внаслідок чого концентрація металів у ґрунті зменшується на 30–86% [54].

Сульфатвідновлювальні бактерії, використовуючи сульфатну групу SO_4^{2-} як акцептор електронів, відновлюють її до сульфідної S^{2-} , яка у свою чергу може утворювати нерозчинні сульфіди, такі як PbS або SbS [56, 96].

Процес біовідновлення відбувається за рахунок того, що мікроорганізми відновлюють токсичні йони металів до менш токсичних або навіть нетоксичних форм. Наприклад, можуть відновлювати шестивалентний хром Cr(VI) до тривалентного хрому Cr(III), який є менш токсичним і менш рухливим у ґрунті. Наприклад, *Bacillus* sp. у консорціумі з *Microbacterium* sp. активно здійснювали цей процес за аеробних умов, а за анаеробних умов відновлення відбувалося штамми видів *Enterococcus*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus* та *Oceanobacillus* [61, 95].

Відновлення купруму з Cu^{2+} до Cu^+ здійснювалося штамом *Pseudomonas* sp., виділеним з ґрунту, забрудненого міддю [18].

Штами *Geothrix*, *Azospira* і *Cellulomonas* були здатними відновлювати Cu^{2+} до металічного купруму $\text{Cu}(0)$, а в присутності біогенного сульфідіду – до Cu_xS , і ці сполуки утворювали наночастки, які потім преципітувалися бактеріальними клітинами [47].

Деяким мікроорганізмам, наприклад, бактеріям роду *Bacillus* притаманна здатність до декількох процесів – біоаккумуляції, біосорбції та біопреципітації [95].

Таким чином, біоремедіацію ґрунтів, забруднених внаслідок бойових дій, здійснюють з використанням шламових реакторів, земельної обробки і компостування, до яких залучають допоміжні методи біостимуляції, біозбагачення та іммобілізації мікроорганізмів. Перспективними є дослідження можливостей використання комбінованих методів, які можуть значно підвищити ефективність біоремедіації, забезпечуючи кращі умови для мікробної активності. Очищення ґрунту від вибухівки, паливно-мастильних матеріалів та важких металів відбувається як за аеробних, так і анаеробних умов з використанням природної або штучно внесеної мікробіоти. Найчастіше використовують представників родів *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Cellulomonas* та інших. Необхідним є подальший пошук штамів, здатних до одночасного очищення ґрунту від декількох типів забруднювачів.



M. B. Galkin, I. V. Strashnova, A. V. Andryushchenko

Odesa I. I. Mechnikov National University,
2 Dvorianska St, Odesa, 65082, Ukraine
e-mail: kgalkin@onu.edu.ua

USE OF MICROORGANISMS IN BIOREMEDIATION OF SOILS CONTAMINATED AS A RESULT OF MILITARY ACTIONS

Summary

*As a result of military activities, soils are contaminated with substances from explosives and firearm mechanisms, fuel, lubricants, and heavy metals, all of which have detrimental effects on ecosystems. This article analyzes the main methods of bioremediation for such contaminated soil. The use of soil slurry reactors, land farming technique, composting, biostimulation, bioaugmentation, and immobilized microorganisms can eliminate up to 99% of toxic substances through natural or introduced microbiota. The duration of the cleanup process ranges from several weeks to several years, depending on the remediation method, climatic conditions, and the level of contamination. The use of combined methods is promising. The remediation is achieved through various mechanisms, including the complete or partial breakdown of substances with their transformation into non-toxic forms (explosives, petroleum products), bioaccumulation, biosorption, bioprecipitation, and bioreduction (heavy metals). Both aerobic and anaerobic microorganisms participate in bioremediation, with representatives from the genera *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Cellulomonas* and others most frequently described in the literature. Further search for strains capable of simultaneously cleaning the soil from multiple types of pollutants is necessary.*

Key words: contamination of soil due to military actions, bioremediation, aerobic and anaerobic decomposers, removal of heavy metals from soil.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дмитренко О.В., Дем'янюк О.С., Погоріла Л.П., Свидинюк Н.Л., Рожжа В.В., Кирилюк П.М., Романенко В.М. Екотоксикологічна оцінка дерново-підзолистого ґрунту за впливу бойових дій // Агроекологічний журнал. – 2023. – № 4. – С. 89–96. <https://doi.org/10.33730/2077-4893.4.2023.293758>
2. Зайцев Ю.О., Грищенко О.М., Романова С.А., Зайцева І.О. Вплив бойових дій на вміст валових форм важких металів у ґрунтах Сумського та Охтирського районів Сумської області // Агроекологічний журнал. – 2022. – № 3. – С. 136–149. <https://doi.org/10.33730/2077-4893.3.2022.266419>
3. Збитки довкіллю внаслідок збройної агресії РФ: актуальна інформація. Сайт Державної екологічної інспекції України <https://www.dei.gov.ua/> (дата звернення 12.08.2024)
4. Кузик А.Д., Товарянський В.І. Вплив воєнних дій на лісові системи України та їх післявоєнне відновлення // Вісник Львівського державного уні-



- верситету безпеки життєдіяльності. – 2023. – № 27. – С. 16–22. <https://doi.org/10.32447/20784643.27.2023.02>
5. Лісова Н. Вплив військових дій в Україні на екологічний стан території // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Географія. – 2017. – № 2. – С. 165–173.
 6. Писаренко П.В., Самойлік М.С., Галицька М.А., Диченко О.Ю., Тараненко С.В. Дослідження впливу техногенного забруднення внаслідок воєнних дій на показники ґрунту агроценозів // Аграрні інновації. – 2022. – № 14. – С. 94–102. <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2022.14.14>
 7. Шумигай І.В., Коніщук В.В., Мороз В.В., Манішевська Н.М. Біогеохімічна, фізіологічна адаптивність пшениці озимої (*Triticum L.*) за впливу важких металів у лісостепу України // Агроекологічний журнал. – 2023. – № 1. – С. 101–109. <https://doi.org/10.33730/2077-4893.1.2023.276734>
 8. Abo-Alkasem M.I., Hassan N.H., Abo Elsoud M.M. Microbial bioremediation as a tool for the removal of heavy metals // Bull. Natl. Res. Cent. – 2023. – 47, 31: <https://doi.org/10.1186/s42269-023-01006-z>
 9. Aburto-Medina A., Shahsavari E., Taha M., Bates A., Van Ieperen L., Ball A.S. The impacts of different biological treatments on the transformation of explosives waste contaminated sludge // Molecules. – 2021. – 16:4814: doi: 10.3390/molecules26164814.
 10. Adams G.O., Fufeyin P.T., Okoro S.E., Ehinomen I. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review // Int. J. Environ. Bioremed. Biodegrad. – 2015. – 3, № 1. – P. 28–39. DOI:10.12691/ijebb-3-1-5
 11. Ahmad F., Hughes J. B. Anaerobic transformation of TNT by *Clostridium* // In: Spain J. C., Hughes J. B., Knackmuss H.-J. (Eds.) Biodegradation of Nitro Aromatic Compounds and Explosives. – Boca Raton, FL: Lewis, 2000. – P. 185–212. DOI:10.1201/9781420032673.ch8
 12. Ajeel N.S., Mohammed A.J. Bioremediation of contaminated soil with hydrocarbons discharged from liquid petroleum gas filling refineries by *Burkholderia cepatia* // International Journal of Health Sciences. – 2022. – 6(S9): P. 1084–1093. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS9.12417>.
 13. Aderonke K.A., Oladimeji O.O., Shittu O.B., Okeyode I.C., Taiwo M.O. Bioaccumulation of heavy metals using selected organisms isolated from electronic waste dumpsite of two south-western states in Nigeria // Appl. Environ. Res. – 2017. – 39(2). – P. 29–40. <https://doi.org/10.35762/AER.2017.39.2.3>
 14. Alam M.Z., Ahmad S. Multi-metal biosorption and bioaccumulation by *Exiguobacterium* sp. ZM-2 // Ann. Microbiol. – 2013. – 63. – P. 1137–1146. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0571-z>
 15. Ali N., Dashti N., Khanafar M., Al-Awadhi H., Radwan S. Bioremediation of soils saturated with spilled crude oil // Sci. Rep. – 2020. – 10: P. 1116. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57224-x>.
 16. Alori E.T., Gabasawa A.I., Elenwo C.E., Agbeyegbe O.O. Bioremediation techniques as affected by limiting factors in soil environment // Front. Soil



- Sci. – 2022. – 2:937186. DOI: 10.3389/fsoil.2022.937186
17. *Altowayti W.A.H., Algaiifi H.A., Bakar S.A., Shahir S.* The adsorptive removal of As (III) using biomass of arsenic resistant *Bacillus thuringiensis* strain WS3: characteristics and modelling studies // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2019. – 172. – P. 176–185. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.067
 18. *Andreazza R., Pieniz S., Wolf L., Lee M.K., Camargo F.A.O., Okeke B.C.* Characterization of copper bioreduction and biosorption by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil // *Science of The Total Environment.* – 2010. – 408(7). – P. 1501–1507. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.12.017
 19. *Anekwe I.M.S., Isa Y.M.* Application of biostimulation and bioventing system as bioremediation strategy for the treatment of crude oil contaminated soils // *Soil Water Res.* – 2024. – 19, № 2. – P. 100–110. DOI: 10.17221/66/2023-SWR
 20. *Belapurkar P., Goyal P., Kar A.* In vitro evaluation of bioremediation capacity of a commercial probiotic, *Bacillus coagulans*, for chromium (VI) and lead (II) toxicity // *J. Pharm. Bioallied Sci.* – 2016. – 8. – P. 272–276. doi: 10.4103/0975-7406.199344
 21. *Bhushan B., Halasz A., Thiboutot S., Ampleman G., Hawari J.* Chemotaxis-mediated biodegradation of cyclic nitramine explosives RDX, HMX, and CL-20 by *Clostridium* sp. EDB2 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – 316, № 3. – P. 816–821. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.120>
 22. *Broomandi P., Guney M., Kim J. R., Karaca F.* Soil Contamination in Areas Impacted by Military Activities: A Critical Review // *Sustainability.* – 2020. – 12, № 21. – P. 9002: <https://doi.org/10.3390/su12219002>
 23. *Brown D. M., Okoro S., van Gils J., van Spanning R., Bonte M., Hutchings T., Linden O., Egbuche U., Bruun K.B., Smith J.W.N.* Comparison of landfarming amendments to improve bioremediation of petroleum hydrocarbons in Niger Delta soils // *Sci. Total Environ.* – 2017. – V. 596–597. – P. 284–292. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.072
 24. *Chen Z., Pan X., Chen H., Lin Z., Guan X.* Investigation of lead (II) uptake by *Bacillus thuringiensis* 016 // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – 31. – P. 1729–1736. doi: 10.1007/s11274-015-1923-1
 25. *Chonoko U.G., Abdullahi I.O., Ado S.A., Whong C.M.Z.* Hydrocarbon degradation by autochthonous species of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Kaduna refinery effluents // *Cont. J. Biol. Sci.* – 2017. – 10(2): P. 10–26. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.839052>
 26. *Corredor D., Duchicela J., Flores F. J., Maya M., Guerron E.* Review of explosive contamination and bioremediation: insights from microbial and bio-omic approaches // *Toxics.* – 2024. – 12. – P. 249: <https://doi.org/10.3390/toxics12040249>
 27. *Craig H., Sisk W., Nelson M., Dana W.* Bioremediation of explosives-contaminated soils: a status review // *In Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research, Manhattan, KS, USA, 23–24 May 1995.* – P. 164.



28. *Danial A.W., Dardir F.M.* Copper biosorption by *Bacillus pumilus* OQ931870 and *Bacillus subtilis* OQ931871 isolated from Wadi Nakheil, Red Sea, Egypt // *Microb. Cell Fact.* – 2023. – 22. – P. 152: doi: 10.1186/s12934-023-02166-3.
29. *Das K., Mukherjee A.K.* Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India // *Bioresour. Technol.* – 2007. – 98(7): P. 1339–1345. doi: 10.1016/j.biortech.2006.05.032
30. *Dong Y., Lang Z., Kong X., Lu D., Liu Z.* Kinetic and multidimensional profiling of accelerated degradation of oil sludge by biostimulation // *Environ. Sci. Process Impact.* – 2015. – 17. – P. 763–774. <https://doi.org/10.1039/c4em00428k>.
31. *Drzyzga O., Bruns-Nagel D., Gorontzy T., Blotevogel K.-H., Gemsa D.* Mass balance studies with ¹⁴C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) mediated by an anaerobic *Desulfovibrio* species and an aerobic *Serratia* species // *Curr. Microbiol.* – 1998. – 37. – P. 380–386. doi: 10.1007/s002849900397
32. *Eaton H.L., Durringer J.M., Murty L.D., Craig A.M.* Anaerobic bioremediation of RDX by ovine whole rumen fluid and pure culture isolates // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – 97. – P. 3699–3710. doi: 10.1007/s00253-012-4172-3
33. *Elgh-Dalgren K., Waara S., Duker A., von Kronhelm T., van Hees P.* Anaerobic bioremediation of a soil with mixed contaminants: explosives degradation and influence on heavy metal distribution, monitored as changes in concentration and toxicity // *Water Air Soil Pollut.* – 2009. – 202. – P. 301 – 313. DOI: 10.1007/s11270-009-9977-z
34. *Fernandez-Lopez C., Posada-Baquero R., Ortega-Calvo J.-J.* Nature-based approaches to reducing the environmental risk of organic contaminants resulting from military activities // *Science of The Total Environment.* – 2022. – 843: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157007>.
35. *Forján R., Lores I., Sierra C., Baragaño D., Gallego J.L.R., Peláez A.I.* Bioaugmentation treatment of a PAH-polluted soil in a slurry bioreactor // *Appl. Sci.* – 2020. – 10, № 8. – P. 2837: <https://doi.org/10.3390/app10082837>
36. *Fowler S.J., Toth C.R.A., Gieg L.M.* Community structure in methanogenic enrichments provides insight into syntrophic interactions in hydrocarbon-impacted environments // *Front. Microbiol.* – 2016. – 7: P. 562. doi: 10.3389/fmicb.2016.00562.
37. *García-Alcántara J.A., Maqueda-Gálvez A.P., Téllez-Jurado A., Hernández-Martínez R., Lizardi-Jiménez M.A.* Maya crude-oil degradation by a *Bacillus licheniformis* consortium isolated from a Mexican thermal source using a bubble column bioreactor // *Water Air Soil Pollut.* – 2016. – 227: P. 413. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3121-7>
38. *Habineza A., Zhai J., Mai T., Mmereki D., Ntakirutimana T.* Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in contaminated soil and microbial remediation options for treatment // *Period. Polytech. Chem. Eng.* – 2017. – 61. – P. 171–187. <https://doi.org/10.3311/PPch.9251>



39. *Hawari, A., Halasz, T., Sheremata T., et al.* Characterization of metabolites during biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) with municipal anaerobic sludge // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – 66, № 6. – P. 2652–2657. doi: 10.1128/aem.66.6.2652-2657.2000
40. *Hryhorczuk D., Levy B.S., Prodanchuk M., Kravchuk O., Bubalo N., Hryhorczuk A., Erickson T.B.* The environmental health impacts of Russia's war on Ukraine // *J. Occup. Med. Toxicol.* – 2024. – 19, 1: <https://doi.org/10.1186/s12995-023-00398-y>
41. *Jaafaryneya M., Amani J., Halabian R.* Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine by *Actinomycetes* species, first time isolated and characterized from water, wastewater, and sludge // *Water Environ. J.* – 2023. – 37, № 3. – P. 538–548. <https://doi.org/10.1111/wej.12857>
42. *Johnsen A.R., Boe U.S., Henriksen P., Malmquist L.M.V., Christensen J.H.* Full-scale bioremediation of diesel-polluted soil in an Arctic landfarm // *Environmental Pollution.* – 2021. – 280: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116946>.
43. *Kaida N., Habib S., Yasid N.A., Shukor M.Y.A.* Biodegradation of petroleum hydrocarbons by *Bacillus spp.*: a review // *Bioremediation Sci. Technol. Res.* – 2018. – 6(2): P. 14–21. <https://doi.org/10.54987/bstr.v6i2.433>.
44. *Kalderis D., Juhasz A. L., Boopathy R., Comfort S.* Soils contaminated with explosives: environmental fate and evaluation of state-of-the-art remediation processes (IUPAC technical report) // *Pure Appl. Chem.* – 2011. – 83, № 7. – P. 1407–1484. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-01-05>.
45. *Keshani-Langroodi S., Lan Y., Stenuit B., Rosen G., Hughes J.B., Sales C.M.* Uncovering the structure and function of microbial communities formed during periodic tilling of TNT and DNT co-contaminated soils // *bioRxiv.* – 2020: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.12.420737v1>
46. *Khan M.I., Yoo K., Kim S., Cheema S.A., Bashir S., Park J.* A *Sporolactobacillus*-, *Clostridium*-, and *Paenibacillus*-dominant microbial consortium improved anaerobic RDX detoxification by starch addition // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2020. – 30, № 6. – P. 839–847. doi: 10.4014/jmb.1910.10034
47. *Kimber R.L., Elizondo G., Jedyka K., Boothman C., Cai R., Bagshaw H., et al.* Copper bioreduction and nanoparticle synthesis by an enrichment culture from a former copper mine // *Environ. Microbiol.* – 2023. – 25(12). – P. 3139–3150. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16488>
48. *Kolwzan B., Grabas K., Pawelczyk A.* Bioremediation of military area contaminated by petroleum products // *Geotechnics of Waste Management and Remediation (GeoCongress): Proc. Conf.* – 2012: <https://ascelibrary.org/doi/10.1061/40970%28309%2963>
49. *Li D.S., Feng J.Q., Liu Y.F., Zhou L., Liu J.F., Gu J.D., Mu B.Z., Yang S.Z.* Enrichment and immobilization of oil-degrading microbial consortium on different sorbents for bioremediation testing under simulated aquatic and soil conditions // *Appl. Environ. Biotechnol.* – 2019. – 5, № 1. – P. 1–11: <https://www.udspub.com/ajj/public/index.php/aeb/article/view/509>



50. Li M., Liu S., Wang Y., Do H., Zhao C. Effect of coexisting metal ions on bio-precipitation of Cu^{2+} phosphate by *Rahnella* sp. LRP3 and its stability in soil // Plant Soil Environ. – 2021. – 67(12). – P. 729–738. <https://doi.org/10.17221/279/2021-PSE>
51. Limcharoensuk T., Sooksawat N., Sumarnrote A., Awutpet T., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Auesukaree C. Bioaccumulation and biosorption of Cd^{2+} and Zn^{2+} by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2015. – 122. – P. 322–330. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.08.013
52. Lin C., Cheruiyot N.K., Bui X.T., Ngo H.H. Composting and its application in bioremediation of organic contaminants // Bioengineered. – 2022. – 13(1). – P. 1073–1089. doi: 10.1080/21655979.2021.2017624
53. Lin C., Sheu D.-S., Lin T.-C., Cao C.M., Grasso D. Thermophilic biodegradation of diesel oil in food waste composting processes without bioaugmentation // Environ Eng Sci. – 2012. – 29(2). – P. 117–123. <https://doi.org/10.1089/ees.2010.0212>
54. Liu P., Zhang Y., Tang Q., Shi S. Bioremediation of metal-contaminated soils by microbially-induced carbonate precipitation and its effects on ecotoxicity and long-term stability // Biochem. Eng. J. – 2021. – 166: 10.1016/j.bej.2020.107856.
55. Lorenz A., Rylott E.L., Strand S.E., Bruce N.C. Towards engineering degradation of the explosive pollutant hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine in the rhizosphere // FEMS Microbiol. Lett. – 2013. – 340. – P. 49–54. doi: 10.1111/1574-6968.12072
56. Lv Y., Zhu X., Zhang M., Liu X., Wang J. In-situ bioremediation of multiple heavy metals contaminated farmland soil by sulfate-reducing bacteria // Polish J. Environ. Stud. – 2022. – 31(2). – P. 1747–1755. <https://doi.org/10.15244/pjoes/141326>
57. Mambwe M., Kalebaila K.K., Johnson T. Photochemical oxidation and land-farming as remediation techniques for oil-contaminated soil // GJESM. – 2024. – 10, № 2. – P. 517–536. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2024.02.07>
58. Marwa A. Influence of organic waste on bioremediation of oil-contaminated soil // Ecological Engineering & Environmental Technology. – 2024. – 25(5). – P. 32–41. <https://doi.org/10.12912/27197050/184238>
59. Mehrotra T., Dev S., Banerjee A., Chatterjee A., Singh R., Aggarwal S. Use of immobilized bacteria for environmental bioremediation: a review // J. Environ. Chem. Eng. – 2021. – 9, № 5: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105920>
60. Mercimek H. A., Dincer S., Guzeldag G., Ozsavli A., Matyar F., Arkut A., Kayis F., Sumengen Ozdenefe M. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *P. aeruginosa* and characterization of some metabolites // Braz. J. Microbiol. – 2015. – 46, № 1. – P. 103–111. doi: 10.1590/S1517-838246120140026
61. Molokwane P.E., Meli C.K., Chirwa E.M.N. Chromium (VI) reduction in activated sludge bacteria exposed to high chromium loading // Water Sci. Technol. – 2008. – 58(2). – P. 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.07.040>
62. Morales-Guzman G., Ferrera-Cerrato R., Rivera-Cruz M.C., Torres-Bustillos L.G., Arteaga-Garibay R.I., Mendoza-Lopez M.R., Esquivel-Cote R.,



- Alarcon A.* Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons // *Appl. Soil Ecol.* – 2017. – 121. – P. 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.003>
63. *Murthy S., Geetha B., Sarangi S.K.* Effect of lead on metallothionein concentration in lead-resistant bacteria *Bacillus cereus* isolated from industrial effluent // *Afr. J. Biotechnol.* – 2011. – 10. – P. 15966–15972. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1645>
64. *Muter O.* Current trends in bioaugmentation tools for bioremediation: a critical review of advances and knowledge gaps // *Microorganisms.* – 2023. – 11, № 3. – P. 710: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030710>
65. *Mystrioti C., Papassiopi N.* A Comprehensive review of remediation strategies for soil and groundwater contaminated with explosives // *Sustainability.* – 2024. – 16, № 3. – P. 961: <https://doi.org/10.3390/su16030961>
66. *Nagar S., Shaw A.K., Anand S., Celin S.M., Rai P.K.* Aerobic biodegradation of HMX by *Planomicrobium flavidum* // *Biotech.* – 2018. – 8, 455: <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1479-5>
67. *Najim A.A., Radeef A.Y., al-Doori I., Jabbar Z.H.* Immobilization: the promising technique to protect and increase the efficiency of microorganisms to remove contaminants // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 2024. – 99. – P. 1707–1733. <https://doi.org/10.1002/jctb.7638>
68. *Nyanhongo G.S., Rodrigue Couto S., Gübitz G.* Coupling of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) metabolites onto humic monomers by a new laccase from *Trametes modesta* // *Chemosphere.* – 2006. – 64. – P. 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.034>
69. *Okeke B.C., Giblin T., Frankenberger W.T.* Reduction of perchlorate and nitrate by salt tolerant bacteria // *Environ. Pollut.* – 2002. – 118, № 3. – P. 357–363. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00288-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00288-3)
70. *Otaiku A.A., Alhaji A.I.* Characterization of microbial species in the biodegradation of explosives, military shooting range, Kaduna, Nigeria // *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.* – 2020. – 7, № 3. – P. 128–147. <https://doi.org/10.15406/jabb.2020.07.00226>
71. *Oviedo-Ocaña E. R., Hernández-Gómez A. M., Ríos M., Portela A., Sánchez-Torres V., Domínguez I., Komilis D.* A Comparison of two-stage and traditional co-composting of green waste and food waste amended with phosphate rock and sawdust // *Sustainability.* – 2021. – 13, № 3. – P. 1109: <https://doi.org/10.3390/su13031109>
72. *Pan Z., Wu Y., Zhai Q., Tang Y., Liu X., Xu X., Liang S., Zhang H.* Immobilization of bacterial mixture of *Klebsiella variicola* FH-1 and *Arthrobacter* sp. NJ-1 enhances the bioremediation of atrazine-polluted soil environments // *Front. Microbiol.* – 2023. – 14:1056264. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1056264
73. *Pichtel J.* Distribution and fate of military explosives and propellants in soil: A review // *Appl. Environ. Soil Sci.* – 2012. – Volume 2012, Article ID 617236. – P. 1–33: <https://doi.org/10.1155/2012/617236>
74. *Pino-Herrera D. O., Pechaud Y., Huguenot D., Esposito G., van Hullebusch E. D., Oturan M. A.* Removal mechanisms in aerobic slurry bioreactors for



- remediation of soils and sediments polluted with hydrophobic organic compounds: an overview // *J. Hazard. Mater.* – 2017. – 339. – P. 427–449. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.013>
75. *Ridene S., Werfelli N., Mansouri A., Landoulsi A., Abbes C.* Bioremediation potential of consortium *Pseudomonas stutzeri* LBR and *Cupriavidus metallidurans* LBJ in soil polluted by lead // *PLoS ONE.* – 2023. – 18(6): e0284120: doi: 10.1371/journal.pone.0284120.
 76. *Rodríguez-Seijo A., Fernández-Calviño D., Arias-Estévez M., et al.* Effects of military training, warfare and civilian ammunition debris on the soil organisms: an ecotoxicological review // *Biol. Fertil. Soils.* – 2024. – 60. – P. 813–844. <https://doi.org/10.1007/s00374-024-01835-8>
 77. *Sable H., Kumar V., Mishra R., et al.* Biosorption of hexavalent chromium by *Shewanella putrefaciens* MTCC 8104: response surface methodology optimization and mechanistic insights // *Indian J. Microbiol.* – 2024: doi: 10.1007/s12088-024-01365-9.
 78. *Sakdapetsiri C., Kaokhum N., Pinyakong O.* Biodegradation of crude oil by immobilized *Exiguobacterium* sp. AO-11 and shelf life evaluation // *Sci. Rep.* – 2021. – 11:12990: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92122-1>
 79. *Saleem H., Farooq H., Mazhar R., Shakil S., Fazal S.* A review on bioremediation of heavy metals and hydrocarbons through plant growth-promoting bacteria and composting // *Journal of Bioresource Management.* – 2024. – 11(1): <https://corescholar.libraries.wright.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1694&context=jbm>.
 80. *Sanjana M., Prajna R., Katti U.S., Kavitha R.V.* Bioremediation – the recent drift towards a sustainable environment // *Environ. Sci.: Adv.* – 2024. – 3. – P. 1097–1110. <https://doi.org/10.1039/D3VA00358B>
 81. *Saravanan A., Swaminaathan P., Kumar P.S., Yaashikaa P.R., Kamalesh R., Rangasamy G.* A comprehensive review on immobilized microbes – biochar and their environmental remediation: mechanism, challenges and future perspectives // *Environ. Res.* – 2023. – 236, 1: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116723>
 82. *Serrano-González M.Y., Chandra R., Castillo-Zacarias C., Robledo-Padilla F., Rostro-Alanis M. de J., Parra-Saldivar R.* Biotransformation and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by microbial metabolism and their interaction // *Defence Technol.* – 2018. – 14, № 2. – P. 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.dt.2018.01.004>
 83. *Sharma A., Biswajit P., Jagdish.* Microbial degradation of expired slurry explosives in mines: a review // *Int. J. Environ. Stud.* – 2014. DOI: 10.1080/00207233.2014.983738
 84. *Sharma K., Sharma P., Sangwan P.* Bioremediation of RDX and HMX contaminated soil employing a biochar-based bioformulation // *Carbon Res.* – 2023. – 2:33: <https://doi.org/10.1007/s44246-023-00068-y>
 85. *Shemer B., Shpigel E., Hazan C., Kabessa Y., Agranat A. J., Belkin S.* Detection of buried explosives with immobilized bacterial bioreporters // *Microb. Biotechnol.* – 2020. – 14. – P. 251–261. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13683>



86. *Shukla S., Mbingwa G., Khanna S., Dalal J., Sankhyan D., Malik A., Badhwar N.* Environment and health hazards due to military metal pollution: a review // *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. – 2023. – 20: doi: 10.1016/j.enmm.2023.100857.
87. *Siles J.A., Margesin R.* Insights into microbial communities mediating the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. – 102. – P. 4409–4421. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8932-6>
88. *Singh N., Gupta S., Marwa N., Pandey V., Verma P.C., Rathaur S., Singh N.* Arsenic mediated modifications in *Bacillus aryabhatai* and their biotechnological application for arsenic bioremediation // *Chemosphere*. – 2016. – 164. – P. 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.119>
89. *Sinha A., Pant K.K., Khare S.K.* Studies on mercury bioremediation by alginate immobilized mercury tolerant *Bacillus cereus* cells // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2012. – 2071: 10.1016/j.ibiod.2011.12.014.
90. *Snape J.R., Walkley N.A., Morby A.P., Nicklin S., White G.F.* Purification, properties, and sequence of glycerol trinitrate reductase from *Agrobacterium radiobacter* // *J. Bacteriol.* – 1997. – 179, № 24. – P. 7796–7802. <https://doi.org/10.1128/jb.179.24.7796-7802.1997>
91. *Sun J., Wang F., Jia X., Wang X., Xiao X., Dong H.* Research progress of bio-slurry remediation technology for organic contaminated soil // *RSC Adv.* – 2023. – 13, № 15. – P. 9903–9917. <https://doi.org/10.1039%2Fd2ra06106f>
92. *Tran T.M., Lee J.U.* Biosorption of Cd by an indigenous Cd-resistant bacterium isolated from soil contaminated with Cd // *Geosci J.* – 2024. – 28. – P. 15–25. <https://doi.org/10.1007/s12303-023-0031-8>
93. *USEPA.* Innovative uses of compost: composting of soils contaminated by explosives // U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, USA. – 1997.
94. *Wang S., Wang X., Zhang C., Li F., Guo G.* Bioremediation of oil sludge contaminated soil by landfarming with added cotton stalks // *Int. Biodeterior. Biodegradation.* – 2016. – 106. – P. 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.014>
95. *Wróbel M., Śliwakowski W., Kowalczyk P., Kramkowski K., Dobrzyński J.* Bioremediation of heavy metals by the genus *Bacillus* // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2023. – 20(6). – P. 4964: 10.3390/ijerph20064964.
96. *Yan X., Gao B., Wang J., Zhu X., Zhang M.* Insights into remediation effects and bacterial diversity of different remediation measures in rare earth mine soil with SO₄²⁻ and heavy metals // *Front. Microbiol.* – 2023. – 14: doi: 10.3389/fmicb.2023.1050635.
97. *Zhang Z., Fan Z., Zhang G., Qin L., Fang J.* Application progress of microbial immobilization technology based on biomass materials // *BioResources.* – 2021. – 16, № 4. – P. 8509–8524. DOI: 10.15376/biores.16.4.Zhang



REFERENCES

1. Dmitrenko OV, Demianiuk OS, Pohorila LP, Svidiniuk NL, Rozha VV, Kyryliuk PM, Romanenko VM. Ekotoksykologichna otsinka dernovo-pidzolysoho hruntu za vplyvu boiovykh dii. *Agroekologichnyi zhurnal*. 2023;(4):89-96. <https://doi.org/10.33730/2077-4893.4.2023.293758> [in Ukrainian].
2. Zaitsev YO, Hryshchenko OM, Romanova SA, Zaitseva IO. Vplyv boiovykh dii na vmist valovykh form vazhkykh metaliv u hruntakh Sums'koho ta Okhtyrskoho raioniv Sums'koi oblasti. *Agroekologichnyi zhurnal*. 2022;(3):136-149. <https://doi.org/10.33730/2077-4893.3.2022.266419> [in Ukrainian].
3. Zbytky dovkilliu vnaslidok zbroinoi ahresii RF: aktualna informatsiia. Sait Derzhavnoi ekologichnoi inspektsii Ukrainy. Available from: <https://www.dei.gov.ua/> (Accessed August 12, 2024) [in Ukrainian].
4. Kuzyk AD, Tovarianskyi VI. Vplyv voiennykh dii na lisovi systemy Ukrainy ta yikh pisliavoienne vidnovlennia. *Visnyk Lvivskoho derzhavnogo universytetu bezpeky zhyttiediialnosti*. 2023;(27):16-22. <https://doi.org/10.32447/20784643.27.2023.02> [in Ukrainian].
5. Lisova N. Vplyv viiskovykh dii v Ukraini na ekologichnyi stan terytorii. *Naukovi zapysky Ternopil'skoho natsionalnogo pedahohichnogo universytetu imeni Volodymyra Hnatiuka. Serii: Heohrafiia*. 2017;(2):165-173 [in Ukrainian].
6. Pysarenko PV, Samoilyk MS, Halytska MA, Dychenko OY, Taranenko SV. Doslidzhennia vplyvu tekhnohennoho zabrudnennia vnaslidok voiennykh dii na pokaznyky hruntu ahrotsenoziv. *Ahrarni innovatsii*. 2022;(14):94-102. <https://doi.org/10.32848/agra.innov.2022.14.14> [in Ukrainian].
7. Shumyhai IV, Konishchuk VV, Moroz VV, Manishevskia NM. Bioheokhimichna, fiziologichna adaptivnist pshenytsi ozymoi (*Triticum L.*) za vplyvu vazhkykh metaliv u lisostepu Ukrainy. *Agroekologichnyi zhurnal*. 2023;(1):101-109. <https://doi.org/10.33730/2077-4893.1.2023.276734>
8. Abo-Alkasem MI, Hassan NH, Abo Elsoud MM. Microbial bioremediation as a tool for the removal of heavy metals. *Bull Natl Res Cent*. 2023;47:31. <https://doi.org/10.1186/s42269-023-01006-z> [in Ukrainian].
9. Aburto-Medina A, Shahsavari E, Taha M, Bates A, Van Ieperen L, Ball AS. The impacts of different biological treatments on the transformation of explosives waste contaminated sludge. *Molecules*. 2021;26(16):4814. doi: 10.3390/molecules26164814.
10. Adams GO, Fufeyin PT, Okoro SE, Ehinomen I. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *Int J Environ Bioremed Biodegrad*. 2015;3(1):28-39. DOI:10.12691/ijebb-3-1-5
11. Ahmad F, Hughes JB. Anaerobic transformation of TNT by *Clostridium*. In: Spain JC, Hughes JB, Knackmuss HJ, editors. *Biodegradation of nitro aromatic compounds and explosives*. Boca Raton, FL: Lewis; 2000. p. 185-212. DOI:10.1201/9781420032673.ch8.
12. Ajeel NS, Mohammed AJ. Bioremediation of contaminated soil with hydrocarbons discharged from liquid petroleum gas filling refineries by *Burkholderia cepacia*. *Int J Health Sci*. 2022;6(S9):1084-1093. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS9.12417>.



13. Aderonke KA, Oladimeji OO, Shittu OB, Okeyode IC, Taiwo MO. Bioaccumulation of heavy metals using selected organisms isolated from electronic waste dumpsite of two south-western states in Nigeria. *Appl Environ Res.* 2017;39(2):29-40. <https://doi.org/10.35762/AER.2017.39.2.3>.
14. Alam MZ, Ahmad S. Multi-metal biosorption and bioaccumulation by *Exiguobacterium* sp. ZM-2. *Ann Microbiol.* 2013;63:1137-1146. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0571-z>.
15. Ali N, Dashti N, Khanafer M, Al-Awadhi H, Radwan S. Bioremediation of soils saturated with spilled crude oil. *Sci Rep.* 2020;10:1116. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57224-x>.
16. Alori ET, Gabasawa AI, Elenwo CE, Agbeyegbe OO. Bioremediation techniques as affected by limiting factors in soil environment. *Front Soil Sci.* 2022;2:937186. DOI: 10.3389/fsoil.2022.937186.
17. Altowayti WAH, Algaifi HA, Bakar SA, Shahir S. The adsorptive removal of As (III) using biomass of arsenic resistant *Bacillus thuringiensis* strain WS3: characteristics and modelling studies. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019;172:176-185. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.067.
18. Andrezza R, Pieniz S, Wolf L, Lee MK, Camargo FAO, Okeke BC. Characterization of copper bioreduction and biosorption by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. *Sci Total Environ.* 2010;408(7):1501-1507. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.12.017.
19. Anekwe IMS, Isa YM. Application of biostimulation and bioventing system as bioremediation strategy for the treatment of crude oil contaminated soils. *Soil Water Res.* 2024;19(2):100-110. DOI: 10.17221/66/2023-SWR.
20. Belapurkar P, Goyal P, Kar A. In vitro evaluation of bioremediation capacity of a commercial probiotic, *Bacillus coagulans*, for chromium (VI) and lead (II) toxicity. *J Pharm Bioallied Sci.* 2016;8:272-276. doi: 10.4103/0975-7406.199344.
21. Bhushan B, Halasz A, Thiboutot S, Ampleman G, Hawari J. Chemotaxis-mediated biodegradation of cyclic nitramine explosives RDX, HMX, and CL-20 by *Clostridium* sp. EDB2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316(3):816-821. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.120>.
22. Broomandi P, Guney M, Kim JR, Karaca F. Soil Contamination in Areas Impacted by Military Activities: A Critical Review. *Sustainability.* 2020;12(21):9002. <https://doi.org/10.3390/su12219002>.
23. Brown DM, Okoro S, van Gils J, van Spanning R, Bonte M, Hutchings T, Linden O, Egbuche U, Bruun KB, Smith JWN. Comparison of landfarming amendments to improve bioremediation of petroleum hydrocarbons in Niger Delta soils. *Sci Total Environ.* 2017;596-597:284-292. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.072.
24. Chen Z, Pan X, Chen H, Lin Z, Guan X. Investigation of lead (II) uptake by *Bacillus thuringiensis* 016. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015;31:1729-1736. doi: 10.1007/s11274-015-1923-1.
25. Chonoko UG, Abdullahi IO, Ado SA, Whong CMZ. Hydrocarbon degradation by autochthonous species of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Kaduna refinery effluents. *Cont J Biol Sci.* 2017;10(2):10-26. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.839052>.



26. Corredor D, Duchicela J, Flores F J, Maya M, Guerrero E. Review of explosive contamination and bioremediation: insights from microbial and bio-omic approaches. *Toxics*. 2024;12:249. <https://doi.org/10.3390/toxics12040249>.
27. Craig H, Sisk W, Nelson M, Dana W. Bioremediation of explosives-contaminated soils: a status review. In: Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research, Manhattan, KS, USA, 23–24 May 1995. p. 164.
28. Danial AW, Dardir FM. Copper biosorption by *Bacillus pumilus* OQ931870 and *Bacillus subtilis* OQ931871 isolated from Wadi Nakheil, Red Sea, Egypt. *Microb Cell Fact*. 2023;22:152. doi: 10.1186/s12934-023-02166-3.
29. Das K, Mukherjee AK. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour Technol*. 2007;98(7):1339–1345. doi: 10.1016/j.biortech.2006.05.032.
30. Dong Y, Lang Z, Kong X, Lu D, Liu Z. Kinetic and multidimensional profiling of accelerated degradation of oil sludge by biostimulation. *Environ Sci Process Impact*. 2015;17:763–774. <https://doi.org/10.1039/c4em00428k>.
31. Drzyzga O, Bruns-Nagel D, Gorontzy T, Blotvogel K.-H, Gemsa D. Mass balance studies with ¹⁴C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) mediated by an anaerobic *Desulfovibrio* species and an aerobic *Serratia* species. *Curr Microbiol*. 1998;37:380–386. doi: 10.1007/s002849900397.
32. Eaton HL, Durringer JM, Murty LD, Craig AM. Anaerobic bioremediation of RDX by ovine whole rumen fluid and pure culture isolates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:3699–3710. doi: 10.1007/s00253-012-4172-3.
33. Elgh-Dalgren K, Waara S, Duker A, von Kronhelm T, van Hees P. Anaerobic bioremediation of a soil with mixed contaminants: explosives degradation and influence on heavy metal distribution, monitored as changes in concentration and toxicity. *Water Air Soil Pollut*. 2009;202:301–313. doi: 10.1007/s11270-009-9977-z.
34. Fernandez-Lopez C, Posada-Baquero R, Ortega-Calvo J-J. Nature-based approaches to reducing the environmental risk of organic contaminants resulting from military activities. *Sci Total Environ*. 2022;843. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157007>.
35. Forján R, Lores I, Sierra C, Baragaño D, Gallego JLR, Peláez AI. Bioaugmentation treatment of a PAH-polluted soil in a slurry bioreactor. *Appl Sci*. 2020;10(8):2837. <https://doi.org/10.3390/app10082837>.
36. Fowler SJ, Toth CRA, Gieg LM. Community structure in methanogenic enrichments provides insight into syntrophic interactions in hydrocarbon-impacted environments. *Front Microbiol*. 2016;7:562. doi: 10.3389/fmicb.2016.00562.
37. García-Alcántara JA, Maqueda-Gálvez AP, Téllez-Jurado A, Hernández-Martínez R, Lizardi-Jiménez MA. Maya crude-oil degradation by a *Bacillus licheniformis* consortium isolated from a Mexican thermal source using a bubble column bioreactor. *Water Air Soil Pollut*. 2016;227:413. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3121-7>.



38. Habineza A, Zhai J, Mai T, Mmereki D, Ntakirutimana T. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in contaminated soil and microbial remediation options for treatment. *Period Polytech Chem Eng.* 2017;61:171–187. <https://doi.org/10.3311/PPch.9251>.
39. Hawari A, Halasz T, Sheremata T, et al. Characterization of metabolites during biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) with municipal anaerobic sludge. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(6):2652–2657. doi: 10.1128/aem.66.6.2652-2657.2000.
40. Hryhorczuk D, Levy BS, Prodanchuk M, Kravchuk O, Bubalo N., Hryhorczuk A, Erickson TB. The environmental health impacts of Russia's war on Ukraine. *J Occup Med Toxicol.* 2024;19(1). <https://doi.org/10.1186/s12995-023-00398-y>.
41. Jaafaryneya M, Amani J, Halabian R. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine by *Actinomyces* species, first time isolated and characterized from water, wastewater, and sludge. *Water Environ J.* 2023;37(3):538–548. <https://doi.org/10.1111/wej.12857>.
42. Johnsen AR, Boe US, Henriksen P, Malmquist LMV, Christensen J.H. Full-scale bioremediation of diesel-polluted soil in an Arctic landfarm. *Environ Pollut.* 2021;280. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116946>.
43. Kaida N, Habib S, Yasid NA, Shukor MYA. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by *Bacillus* spp.: a review. *Bioremediation Sci Technol Res.* 2018;6(2):14–21. <https://doi.org/10.54987/bstr.v6i2.433>.
44. Kalderis D, Juhasz AL, Boopathy R, Comfort S. Soils contaminated with explosives: environmental fate and evaluation of state-of-the-art remediation processes (IUPAC technical report). *Pure Appl Chem.* 2011;83(7):1407–1484. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-01-05>.
45. Keshani-Langroodi S, Lan Y, Stenuit B, Rosen G, Hughes JB, Sales CM. Uncovering the structure and function of microbial communities formed during periodic tilling of TNT and DNT co-contaminated soils. *bioRxiv.* 2020. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.12.420737v1>.
46. Khan MI, Yoo K, Kim S, Cheema SA, Bashir S, Park J. A *Sporolactobacillus*-, *Clostridium*-, and *Paenibacillus*-dominant microbial consortium improved anaerobic RDX detoxification by starch addition. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2020; 30(6):839–847. doi: 10.4014/jmb.1910.10034.
47. Kimber RL, Elizondo G, Jedyka K, Boothman C, Cai R, Bagshaw H et al. Copper bioreduction and nanoparticle synthesis by an enrichment culture from a former copper mine. *Environ. Microbiol.* 2023; 25(12):3139–3150. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16488>.
48. Kolwzan B, Grabas K, Pawelczyk A. Bioremediation of military area contaminated by petroleum products. *Geotechnics of Waste Management and Remediation (GeoCongress): Proc. Conf.* 2012. <https://ascelibrary.org/doi/10.1061/40970%28309%2963>.
49. Li DS, Feng JQ, Liu YF, Zhou L, Liu JF, Gu JD, Mu BZ, Yang SZ. Enrichment and immobilization of oil-degrading microbial consortium on different sorbents for bioremediation testing under simulated aquatic and soil condi-



- tions. Appl. Environ. Biotechnol. 2019; 5(1):1–11. <https://www.udspub.com/ajj/public/index.php/aeb/article/view/509>.
50. Li M, Liu S, Wang Y, Do H, Zhao C. Effect of coexisting metal ions on bio-precipitation of Cu^{2+} phosphate by *Rahnella sp.* LRP3 and its stability in soil. Plant Soil Environ. 2021; 67(12):729–738. <https://doi.org/10.17221/279/2021-PSE>.
 51. Limcharoensuk T, Sooksawat N, Sumarnrote A, Awutpet T, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Auesukaree C. Bioaccumulation and biosorption of Cd^{2+} and Zn^{2+} by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2015; 122:322–330. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.08.013.
 52. Lin C, Cheruiyot NK, Bui XT, Ngo HH. Composting and its application in bioremediation of organic contaminants. Bioengineered. 2022; 13(1):1073–1089. doi: 10.1080/21655979.2021.2017624.
 53. Lin C, Sheu D-S, Lin T-C, Cao CM, Grasso D. Thermophilic biodegradation of diesel oil in food waste composting processes without bioaugmentation. Environ Eng Sci. 2012; 29(2):117–123. <https://doi.org/10.1089/ees.2010.0212>.
 54. Liu P, Zhang Y, Tang Q, Shi S. Bioremediation of metal-contaminated soils by microbially-induced carbonate precipitation and its effects on ecotoxicity and long-term stability. Biochem. Eng. J. 2021; 166. doi: 10.1016/j.bej.2020.107856.
 55. Lorenz A, Rylott EL, Strand SE, Bruce NC. Towards engineering degradation of the explosive pollutant hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine in the rhizosphere. FEMS Microbiol. Lett. 2013; 340:49–54. doi: 10.1111/1574-6968.12072.
 56. Lv Y, Zhu X, Zhang M, Liu X, Wang J. In-situ bioremediation of multiple heavy metals contaminated farmland soil by sulfate-reducing bacteria. Polish J. Environ. Stud. 2022; 31(2):1747–1755. <https://doi.org/10.15244/pjoes/141326>.
 57. Mambwe M, Kalebaila KK, Johnson T. Photochemical oxidation and land-farming as remediation techniques for oil-contaminated soil. GJESM. 2024; 10(2):517–536. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2024.02.07>.
 58. Marwa A. Influence of organic waste on bioremediation of oil-contaminated soil. Ecological Engineering & Environmental Technology. 2024; 25(5):32–41. <https://doi.org/10.12912/27197050/184238>.
 59. Mehrotra T, Dev S, Banerjee A, Chatterjee A, Singh R, Aggarwal S. Use of immobilized bacteria for environmental bioremediation: a review. J. Environ. Chem. Eng. 2021; 9(5). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105920>.
 60. Mercimek HA, Dincer S, Guzeldag G, Ozsavli A, Matyar F, Arkut A, Kayis F, Sumengen Ozdenefe M. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *P. aeruginosa* and characterization of some metabolites. Braz. J. Microbiol. 2015; 46(1):103–111. doi: 10.1590/S1517-838246120140026.
 61. Molokwane PE, Meli CK, Chirwa EMN. Chromium (VI) reduction in activated sludge bacteria exposed to high chromium loading. Water Sci. Technol. 2008; 58(2):399–405. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.07.040>.



62. Morales-Guzman G, Ferrera-Cerrato R, Rivera-Cruz MC, Torres-Bustillos L.G., Arteaga-Garibay RI, Mendoza-Lopez MR, Esquivel-Cote R, Alarcon A. Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons. *Appl. Soil Ecol.* 2017; 121:127-134. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.003>.
63. Murthy S, Geetha B, Sarangi SK. Effect of lead on metallothionein concentration in lead-resistant bacteria *Bacillus cereus* isolated from industrial effluent. *Afr. J. Biotechnol.* 2011; 10:15966–15972. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1645>.
64. Muter O. Current trends in bioaugmentation tools for bioremediation: a critical review of advances and knowledge gaps. *Microorganisms.* 2023; 11(3):710. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030710>.
65. Mystrioti C, Papassiopi NA. Comprehensive review of remediation strategies for soil and groundwater contaminated with explosives. *Sustainability.* 2024; 16(3):961. <https://doi.org/10.3390/su16030961>.
66. Nagar S, Shaw AK, Anand S, Celin SM, Rai PK. Aerobic biodegradation of HMX by *Planomicrobium flavidum*. *Biotech.* 2018; 8:455. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1479-5>.
67. Najim AA, Radeef AY, al-Doori I, Jabbar ZH. Immobilization: the promising technique to protect and increase the efficiency of microorganisms to remove contaminants. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2024; 99:1707–1733. <https://doi.org/10.1002/jctb.7638>.
68. Nyanhongo GS, Rodriguez Couto S, Gübitz G. Coupling of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) metabolites onto humic monomers by a new laccase from *Trametes modesta*. *Chemosphere.* 2006; 64:309–319. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.034>.
69. Okeke BC, Giblin T, Frankenberger WT. Reduction of perchlorate and nitrate by salt tolerant bacteria. *Environ. Pollut.* 2002; 118(3):357–363. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00288-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00288-3).
70. Otaiku AA, Alhaji AI. Characterization of microbial species in the biodegradation of explosives, military shooting range, Kaduna, Nigeria. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.* 2020; 7(3):128–147. <https://doi.org/10.15406/jabb.2020.07.00226>.
71. Oviedo-Ocaña ER, Hernández-Gómez AM, Ríos M, Portela A, Sánchez-Torres V, Domínguez I, Komilis DA. Comparison of two-stage and traditional co-composting of green waste and food waste amended with phosphate rock and sawdust. *Sustainability.* 2021; 13(3):1109. <https://doi.org/10.3390/su13031109>.
72. Pan Z, Wu Y, Zhai Q, Tang Y, Liu X, Xu X, Liang S, Zhang H. Immobilization of bacterial mixture of *Klebsiella variicola* FH-1 and *Arthrobacter sp.* NJ-1 enhances the bioremediation of atrazine-polluted soil environments. *Front. Microbiol.* 2023; 14:1056264. doi: 10.3389/fmicb.2023.1056264.
73. Pichtel J. Distribution and fate of military explosives and propellants in soil: A review. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2012; Volume 2012, Article ID 617236. P. 1–33. <https://doi.org/10.1155/2012/617236>.



74. Pino-Herrera DO, Pechaud Y, Huguenot D, Esposito G, van Hullebusch ED., Oturan MA. Removal mechanisms in aerobic slurry bioreactors for remediation of soils and sediments polluted with hydrophobic organic compounds: an overview. *J. Hazard. Mater.* 2017; 339:427–449. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.013>.
75. Ridene S, Werfelli N, Mansouri A, Landoulsi A, Abbes C. Bioremediation potential of consortium *Pseudomonas stutzeri* LBR and *Cupriavidus metallidurans* LBJ in soil polluted by lead. *PLoS ONE.* 2023; 18(6): e0284120. doi: 10.1371/journal.pone.0284120.
76. Rodríguez-Seijo A, Fernández-Calviño D, Arias-Estévez M, et al. Effects of military training, warfare and civilian ammunition debris on the soil organisms: an ecotoxicological review. *Biol. Fertil. Soils.* 2024; 60:813–844. <https://doi.org/10.1007/s00374-024-01835-8>.
77. Sable H, Kumar V, Mishra R, et al. Biosorption of hexavalent chromium by *Shewanella putrefaciens* MTCC 8104: response surface methodology optimization and mechanistic insights. *Indian J. Microbiol.* 2024. doi: 10.1007/s12088-024-01365-9.
78. Sakdapetsiri C, Kaokhum N, Pinyakong O. Biodegradation of crude oil by immobilized *Exiguobacterium sp.* AO-11 and shelf life evaluation. *Sci. Rep.* 2021; 11:12990. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92122-1>.
79. Saleem H, Farooq H, Mazhar R, Shakil S, Fazal S. A review on bioremediation of heavy metals and hydrocarbons through plant growth-promoting bacteria and composting. *Journal of Bioresource Management.* 2024; 11(1). <https://corescholar.libraries.wright.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1694&context=jbm>.
80. Sanjana M, Prajna R, Katti US, Kavitha RV. Bioremediation – the recent drift towards a sustainable environment. *Environ. Sci.: Adv.* 2024; 3:1097–1110. <https://doi.org/10.1039/D3VA00358B>.
81. Saravanan A, Swaminaathan P, Kumar PS, Yaashikaa PR, Kamalesh R, Rangasamy GA comprehensive review on immobilized microbes - biochar and their environmental remediation: mechanism, challenges and future perspectives. *Environ. Res.* 2023; 236(1). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116723>.
82. Serrano-González MY, Chandra R, Castillo-Zacarias C, Robledo-Padilla F, Rostro-Alanis M. de J, Parra-Saldivar R. Biotransformation and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by microbial metabolism and their interaction. *Defence Technol.* 2018; 14(2):151–164. <https://doi.org/10.1016/j.dt.2018.01.004>.
83. Sharma A, Biswajit P, Jagdish. Microbial degradation of expired slurry explosives in mines: a review. *Int. J. Environ. Stud.* 2014. doi: 10.1080/00207233.2014.983738.
84. Sharma K, Sharma P, Sangwan P. Bioremediation of RDX and HMX contaminated soil employing a biochar-based bioformulation. *Carbon Res.* 2023; 2:33. <https://doi.org/10.1007/s44246-023-00068-y>.
85. Shemer B, Shpigel E, Hazan C, Kabessa Y, Agranat AJ, Belkin S. Detection of buried explosives with immobilized bacterial bioreporters. *Microb.*



- Biotechnol. 2020; 14:251–261. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13683>.
86. Shukla S, Mbingwa G, Khanna S, Dalal J, Sankhyan D, Malik A, Badhwar N. Environment and health hazards due to military metal pollution: a review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 2023; 20. doi: 10.1016/j.enmm.2023.100857.
 87. Siles JA, Margesin R. Insights into microbial communities mediating the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 102:4409–4421. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8932-6>.
 88. Singh N, Gupta S, Marwa N, Pandey V, Verma PC, Rathaur S, Singh N. Arsenic mediated modifications in *Bacillus aryabhatai* and their biotechnological application for arsenic bioremediation. *Chemosphere*. 2016; 164:524–534. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.119>.
 89. Sinha A, Pant KK, Khare SK. Studies on mercury bioremediation by alginate immobilized mercury tolerant *Bacillus cereus* cells. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2012. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.12.014.
 90. Snape JR, Walkley NA, Morby AP, Nicklin S, White GF. Purification, properties, and sequence of glycerol trinitrate reductase from *Agrobacterium radiobacter*. *J. Bacteriol.* 1997; 179(24):7796–7802. <https://doi.org/10.1128/jb.179.24.7796-7802.1997>.
 91. Sun J, Wang F, Jia X, Wang X, Xiao X, Dong H. Research progress of bio-slurry remediation technology for organic contaminated soil. *RSC Adv.* 2023; 13(15):9903–9917. <https://doi.org/10.1039/d2ra06106f>.
 92. Tran TM, Lee JU. Biosorption of Cd by an indigenous Cd-resistant bacterium isolated from soil contaminated with Cd. *Geosci J.* 2024; 28:15–25. <https://doi.org/10.1007/s12303-023-0031-8>.
 93. USEPA. Innovative uses of compost: composting of soils contaminated by explosives. U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, USA. 1997.
 94. Wang S, Wang X, Zhang C, Li F, Guo G. Bioremediation of oil sludge contaminated soil by landfarming with added cotton stalks. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 2016; 106:150–156. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.014>.
 95. Wróbel M, Śliwakowski W, Kowalczyk P, Kramkowski K, Dobrzyński J. Bioremediation of heavy metals by the genus *Bacillus*. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2023; 20(6):4964. doi: 10.3390/ijerph20064964.
 96. Yan X, Gao B, Wang J, Zhu X, Zhang M. Insights into remediation effects and bacterial diversity of different remediation measures in rare earth mine soil with SO₄²⁻ and heavy metals. *Front. Microbiol.* 2023; 14. doi: 10.3389/fmicb.2023.1050635.
 97. Zhang Z, Fan Z, Zhang G, Qin L, Fang J. Application progress of microbial immobilization technology based on biomass materials. *BioResources.* 2021; 16(4):8509–8524. doi: 10.15376/biores.16.4.Zhang.

Стаття надійшла до редакції 26.08.2024 р.



A. G. Merlich, O. Iu. Kalnytska, M. V. Shutylo,
O. O. Kovtun, V. O. Ivanytsia

Odesa I. I. Mechnikov National University,
2 Dvorianska St, Odesa, 65082, Ukraine
tel.: +38 096 4367403, e-mail: andriymerlich@gmail.com

CHARACTERIZATION OF LACTOBACTERIA FROM THE BLACK SEA WATER AND MUSSELS WITH THE POTENTIAL TO PRODUCE ANTIBACTERIAL COMPOUNDS

Aim. Characterization of lactic acid bacteria (LAB) from water and mussels of the Black Sea with the potential to produce antibacterial compounds. **Methods.** The isolation of lactobacteria from water and mussels, their enumeration were performed by standard microbiological methods. Determination of their morphological, tinctorial, cultural, and biochemical characteristics were performed by Gram staining with immersion microscopy, describing the growth in liquid MRS media with and without 6.5% NaCl, catalase test. Genus-specific classic PCR was used for identification of isolated bacteria. To study the antagonistic interactions of the strains the perpendicular streak method was used. **Results.** In water of the Black Sea from Odesa bay, collected in winter period, 2×10^2 – 4.8×10^2 CFU/mL of lactobacteria were found, while only in three mussels from seven (42.9%) LAB were detected ($1.7 \times 10^{\pm 0.7}$ CFU/mL). Thirteen new strains of lactobacteria were isolated and characterized – eight strains from water and five from mussels. Among them, nine strains were identified as *Enterococcus* sp., one strain – as *Lactobacillus* sp., and three LAB strains remained unidentified. The new strains *Enterococcus* W1.1, *Enterococcus* W1.2, *Enterococcus* W1.3, *Enterococcus* W2.3, and *Enterococcus* M7.1 exhibited antagonistic activity against other closely related strains and *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157. **Conclusions.** The Black Sea water and mussels tissue liquor in winter period contain 2×10^2 – 4.8×10^2 CFU/mL and $1.7 \times 10^{\pm 0.7}$ CFU/mL of LAB, respectively. The strains *Enterococcus* W1.1, *Enterococcus* W1.2, *Enterococcus* W1.3, *Enterococcus* W2.3, and *Enterococcus* M7.1 are potential producers of antibacterial compounds.

Key words: lactobacteria, the Black Sea water, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, mussels, bacteriocins.

The group of lactic acid bacteria (LAB) includes Gram positive, catalase- and oxidase negative, non-spore-forming microorganisms producing lactic acid as the main compound as well as other organic acids. The majority of lactobacteria are safe and they have huge biotechnological potential. Recently, lactobacteria of marine origin especially gained attention because it is supposed that these microorganisms, as well as their metabolic products, are attractive for pharmaceutical, cosmetic, and



food industry, for obtaining of biopolymers and application in aquaculture [6, 11, 14].

Despite that a lot of scientific information on terrestrial lactobacteria is available, data on representatives of this group from water sources are scarce. Moreover, there are only several scientific papers about lactobacteria namely from Odesa bay of the Black Sea. Ukrainian scientists have showed presence of lactobacteria in such hydrobionts as sponges, sea bass, cod, mackerel, dolphins, mussels, algae [1, 3, 4]. Thus, it was established that in sponges of *Haliclona* genus only representatives of *Lactobacillus* were observed: *L. bifermentans*, *L. parabuchneri*, and *L. vaccinostercus* [3]. It was established by Yamborko et al. that LAB of *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Enterococcus* genera are present in intestine of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), mackerel (*Scomber scomber*), sea bass (*Perca fluviatilis*) and cod (*Gadus morhua morhua*). Representatives of *Enterococcus* genus were isolated only from intestine of dolphins in amount 10^2 – 10^3 CFU/sm³ [4]. Vasylieva et al. have showed the presence of LAB of the genera *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, and *Leuconostoc* in Black Sea mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and on surface of algae *Enteromorpha*, *Ulva*, *Cladophora*, *Porphyra*, and *Polysiphonia*. By using fatty acids composition analysis, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Pediococcus pentosaceus*, and *Leuconostoc mesenteroides* species were identified [1].

Despite the conducted research on isolation, characterization, and identification of LAB from hydrobionts from Odesa bay of the Black Sea, there is not enough information on lactobacteria strains isolated specifically from marine water in winter time. Biotechnological potential of the Black Sea strains of LAB, in particular their ability to produce antimicrobial compounds including bacteriocins, is even less researched.

The aim of this work was to characterize LAB from water and mussels of Black Sea with potential to produce antibacterial compounds.

Materials and methods

Samples of water and mussels were collected by Dr. Kovtun O.O. in January 2023 from the Odesa Bay of the Black Sea near the hydrobiology station of the Odesa I. I. Mechnikov National University. A total of nine samples were analyzed – two water samples and seven samples of mussels.

For the isolation of lactobacteria, medium-sized mussels with closed, intact shells were selected and processed to collect tissue liquor according to the literature [10]. Undiluted samples as well as tenfold serial dilutions were inoculated in a volume of 100 μ L on MRS-agar with pH 5.7 (MERCK, Germany) and on such the medium with neutral pH, which was prepared according to [8]. The inoculated plates were incubated in a thermostat at 37 °C and microanaerobic conditions for 48 hours.

At the same time, in order to determine the total microbial number (TMN) for calculation of the percentage of LAB among the total microbiota, inoculation was carried out on nutrient agar (NA) provided by the Himedia company (India) and the plates were incubated at 37 °C for 48 hours.



The colonies number was counted and calculated per 1 mL in a standard manner. Statistical data processing was carried out in the Microsoft Office Excel program. The mean value, standard deviation, and confidence were calculated.

To isolate pure cultures of lactobacteria, colonies similar in morphology to LAB were selected and inoculated again on new plate using the streak method. Cell morphology, tinctorial properties, and absence of spore formation were determined by Gram staining followed by microscopy using a MICROmed microscope (Ukraine) with a total magnification of 1600X. The study of cultural properties involved determining the morphology of colonies on MRS agar, the growth in MRS broth, gas formation, and the presence of growth in liquid MRS medium containing 6.5% NaCl. Among the biochemical properties, the presence of catalase enzyme was determined using 3% hydrogen peroxide [18].

Classical polymerase chain reaction (PCR) was carried out in order to identify the isolated LAB to the genus level. The heat lysis method using a solution of 1% Triton X-100 and 0.25% sodium azide was used to isolate DNA from the studied marine bacteria [21]. The presence and concentration of the obtained DNA was determined by gel electrophoresis and spectrophotometry using the UV5Nano device (Mettler Toledo, USA).

In order to identify *Enterococcus* bacteria, PCR was performed with primers E1 (5'-TCAACCGGGGAGGGT-3') and E2 (5'-ATTACTAGCGATTCCGG-3') [7]. The reaction mixture for PCR was of the following composition: 5 units of Taq DNA polymerase – 0.45 µL, primer 1 – 1.25 µL, primer 2 – 1.25 µL, 8 mM mixture of deoxynucleotide triphosphates – 0.56 µL, 10X Taq buffer + NH₄ – 2.25 µL, DNA – 1 µL, 25 mM MgCl₂ aqueous solution – 2.7 µL, deionized water – 13 µL. The final volume of the mixture was 21.46 µL [7, 13, 16, 21]. DNA of the strain *Enterococcus italicus* ONU547 was used as a positive control. Amplification parameters are listed in Table 1.

Table 1
Parameters of amplification which were used for genus specific PCR in order to identify *Enterococcus* and *Lactobacillus* according to the literature data [9, 13]

For <i>Enterococcus</i>			For <i>Lactobacillus</i>		
Initial denaturation	95 °C for 4 min		Initial denaturation	95 °C for 5 min	
Denaturation	95 °C for 30 sec	30 cycles	Denaturation	95 °C for 30 sec	30 cycles
Primer annealing	55 °C for 1 min		Primer annealing	55 °C for 30 sec	
Elongation	72 °C for 1 min		Elongation	72 °C for 30 sec	
Final elongation	72 °C for 7 min		Final elongation	72 °C for 7 min	

For identification of microorganisms belonging to *Lactobacillus* genus the following primers were used: LbLMA1 (5'-CTCAAACTAAACAAAGTTTC-3') and R16-1 (5'-CTTGACACACCGCCCGTTCA-3') [9].

The reaction mixture contained the following components: 5 units of Taq DNA polymerase – 1.16 µL, primer 1 – 2.77 µL, primer 2 – 2.77 µL, 10X PCR buf-



fer – 5 μ L, 10 mM mixture of deoxynucleotide triphosphates – 1 μ L, DNA– 2 μ L, 25 mM MgCl₂ aqueous solution – 6 μ L, deionized water – 25.3 μ L. The total volume of the mixture was 50 μ L [9, 13, 15, 21]. The DNA of the *E. italicus* ONU547 strain was used as a negative control. Amplification was carried out according to the parameters listed in Table 1.

After the PCR, the presence of amplification products was determined by electrophoresis in a 1% agarose gel with 1X Tris-acetic buffer [9]. After the electrophoresis, the staining with ethidium bromide was performed and photographed using the Gel Doc video system (Bio-Rad, USA) in the "Trans UV" mode.

Study of antagonistic interactions of lactobacteria was carried out by the perpendicular streak method according to [19]. Five strains of isolated bacteria (W1.1, W1.2, W1.3, M4.1, M5.2) were used as test cultures, as well as the indicator strain *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157. The presence of zones of growth inhibition from 2 mm to 30 mm was noted indicating the production of antimicrobial compounds [19].

Results and discussion

Isolation of lactobacteria from the marine sources

As a result of the inoculation of nine samples collected in the Odessa bay of Black Sea (two water and seven mussel samples) on nutrient media, microorganisms growing on MRS with an acidic or neutral pH value were isolated from most of them (Table 2). No LAB-like colonies were isolated from Mussel №1 and Mussel №3 samples. The number of microorganisms on these media after inoculation of other samples ranged from 1×10 CFU/mL to 3×10^3 CFU/mL.

In average, the TMN of seawater was $1.7 \times 10^6 \pm 0.3$ CFU/mL, which is in agreement with the data of other scientists, who found 1.1×10^6 CFU/ml of microorganisms in the Black Sea water sampled in October when cultured on the NA [2].

In contrast to the water samples, the TMN of the tissue liquor of mussels fluctuated in a wide range depending on the studied mussel – from 4.11×10^3 to 1.085×10^7 CFU/mL.

Table 2

Results of inoculation of samples of marine water and mussels collected in winter time on solid media

Sample	CFU/mL		
	MRS with pH 5.7	MRS with pH 7	NA (TMN)
Water №1	4.8×10^2	3×10^3	1.6×10^6
Water №2	3×10	1.1×10^2	1.89×10^6
Mussel №1	0	0	5.5×10^5
Mussel №2	0	1×10	1×10^5
Mussel №3	0	0	2.52×10^6
Mussel №4	0	1×10^2	1.08×10^6
Mussel №5	0	9×10	5.23×10^3
Mussel №6	0	7×10	4.11×10^3
Mussel №7	0	2×10	1.085×10^7



All colonies that grew on MRS media and visually resembled LAB were transferred to new Petri dishes to obtain pure cultures and were subsequently characterized by a complex of tinctorial, morphological, cultural, and biochemical features.

By the Gram staining, determining the absence of spore formation and catalase activity, the presence of a sour smell [7, 18] it was established that part of the cultures we isolated belonged to the LAB group. After that, we recalculated their content in 1 mL of test samples and calculated the percentage of lactobacteria from the TMN (Table 3). It was established that LAB were isolated from both samples of sea water, but in different numbers: in the first sample, 4.8×10^2 CFU/mL of lactobacteria were found, and in the second one – only 2×10 CFU/mL. They composed only 0.03% and 0.001% of the TMN, respectively.

Table 3

LAB bacteria number in samples of marine water and mussels

Sample	CFU/mL of lactobacteria	% of LAB among other microbiota representatives
Water №1	4.8×10^2	0.03
Water №2	2×10	0.001
Mussel №1	0	-
Mussel №2	0	-
Mussel №3	0	-
Mussel №4	1×10	0.0009
Mussel №5	2×10	0.4
Mussel №6	0	-
Mussel №7	2×10	0.0002

And even smaller number of lactobacteria was found in the Black Sea mussels collected in winter. Indeed, LAB were found in only three mussels out of seven (42.9%). The average number of LAB in the studied hydrobionts, among those where they were detected, was $1.7 \times 10 \pm 0.7$ CFU/mL. The detected lactobacteria composed a very low percentage of the total microbiota of mussels – from 0.0002 to 0.4%. To our knowledge, this is the first report on the composition of lactic acid microbiota of the water and mussels of the Odessa Bay of the Black Sea in winter.

The number of LAB in seawater and mussels in our study was significantly lower when compared to studies of Kranga et al., which showed that in October the number of lactobacteria in the Black Sea water was 1.42×10^3 CFU/mL, and inside mussels – 1.33×10^4 CFU/mL [2]. This difference can be explained by the lower water temperature in January, when our samples were collected, compared to October. As for the number of lactobacteria in mussels, it was also significantly lower than that shown in other works. Thus, in the publication of Bulgarian scientists who also isolated LAB from Black Sea mussels, but from the Bulgarian water area, it was reported that 83×10^8 CFU/mL of lactobacteria were isolated [12]. This difference can also be explained by the different seasonality of sampling.



Study of morphological, tinctorial, cultural properties and identification of the isolated strains

As a result of the conducted staining and microscopy of the preparations, it was established that the studied bacteria of all the strains were stained positively by Gram. Most of them had a rounded shape, except for W2.4, which was rod-shaped. The cells in the preparations were placed singly, in pairs, in clusters, in chains, or in tetrads. No spores was observed in the cells of the studied microorganisms.

Among the cultural characteristics, the morphology of colonies on the solid MRS medium, growth in MRS broth without and with 6.5% NaCl were studied. All the isolated strains on MRS medium with neutral pH formed round, small colonies with smooth surfaces, convex profiles, and regular edges. They were white or white-gray in color, shiny and opaque, had a uniform structure and a soft or slimy consistency. None of the strains produced a pigment.

As a result of the conducted research, it was found that bacteria of all the strains, with the exception of M 5.1, gave turbidity when growing in MRS broth. None of the strains formed films and was capable of gas formation. All samples had a sediment. Most cultures, with the exception of M 5.1, had a pronounced sour smell.

Intensive growth of the majority of bacterial isolates was also observed in MRS broth in the presence of 6.5% NaCl, which can indicate that they belong to the genus *Enterococcus* [18]. Only M5.2 strain showed weak growth, while M5.1, M4.1, and W2.4 showed no growth at all. Probably, these bacteria belong to other taxonomic groups. The morphology of cells of the strain W2.4 indicates the possibility of their belonging to the genus *Lactobacillus*.

As a result of the PCR with E1/E2 primers, we found that in the case of nine strains, namely W1.1, W1.2, W1.3, W1.4, W1.5, W1.dc, M5.2, M7.1, and W2.3, amplification products with a size of approximately 700 base pairs (b. p.) were formed (Fig. 1), which indicates that the studied strains belong to the genus *Enterococcus* [13].

Bacteria of the genus *Enterococcus* in mussels of the Odesa Bay of the Black Sea were also detected by Vasilyeva et al., however, the characteristics of their strains, besides of sensitivity to antibiotics, were not published [1]. In the works of other scientists LAB, which were isolated from the Black Sea mussels of the Bulgarian coast, belonged to the genera *Lactobacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Streptococcus* (*L. plantarum*, *L. sakei*, *L. brevis*, *Sporolactobacillus kofuensis*, *Streptococcus gallolyticus ss gallolyticus*) and enterococci were not found among them [10, 11].

In order to identify the rest of the strains that showed a negative reaction with the E1/E2 primers, the PCR was performed with primers for the genus *Lactobacillus*. As a result of the PCR, we found the presence of amplification products with a size of approximately 250 b. p. in the case of only one strain – W2.4 (Fig. 2) indicating its belonging to the *Lactobacillus* genus [9].

Thus, among the microbiota of seawater and mussels, collected in winter time, we found cultivable *Enterococcus* and *Lactobacillus* bacteria. However, for a more detailed study of the composition of lactobacteria – representatives of the microbiota of water and mussels of the Black Sea, further research is needed. It is



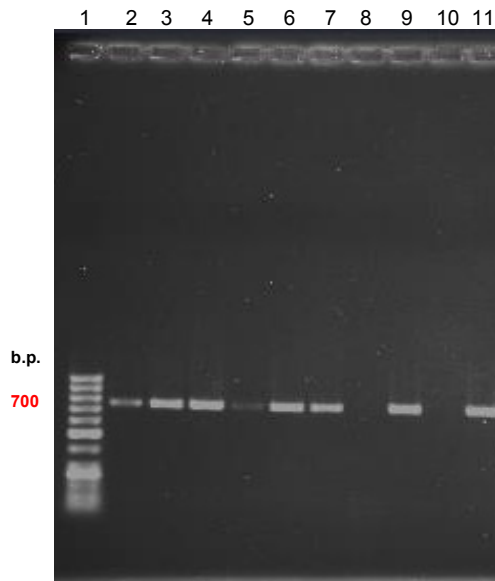


Fig. 1. Electropherogram of the amplification products obtained by the classic PCR with the primers E1 and E2

Footnote: 1 – molecular weight marker GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA), 2 – W1.1, 3 – W1.2, 4 – W1.3, 5 – W1.4, 6 – W1.5, 7 – W1.dc, 8 – M5.1, 9 – M5.2, 10 – negative control (solution for isolation DNA), 11 – positive control (*E. italicus* ONU547)

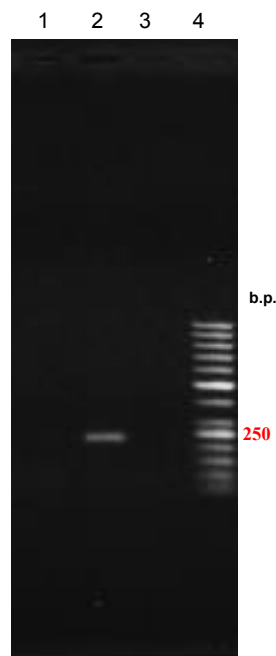


Fig. 2. Electropherogram of amplicons obtained by the PCR with the primers LbLMA1 and R16-1

Footnote: 1 – M7.2, 2 – W2.4, 3 – negative control (DNA of *E. italicus* ONU547), 4 – molecular weight marker GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)



known that the MRS medium is suitable for cultivation of limited range of lactobacteria (only *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Pediococcus*), and in order to isolate a wider spectrum of them, it is necessary to use M17 medium and others [5, 8], that is planned in our further works. Moreover, by standard microbiological methods, which consist in the use of culture media to isolate microorganisms from the environment, less than 1% of them can be detected. That is why, in order to expand our ideas about the composition of the microbiota of any hydrobiont, in addition to cultivation methods, molecular biology approaches are needed [5, 20].

Study of antagonistic interactions of the isolated strains of marine lactobacteria and their potential to produce bacteriocins

As a result of the conducted experiments, it was observed that the strains of *Enterococcus* W1.1, *Enterococcus* W1.2, *Enterococcus* W1.3 showed antagonistic activity only against the test strain *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 (Table 4). Such the specificity of antimicrobial activity can indicate the production by these strains of specific factors of active antagonism, such as bacteriocins. The sensitivity of *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 to bacteriocins of LAB is well known [17]. We plan further studies to confirm this hypothesis.

Table 4

Results of determination of antagonistic interactions by perpendicular streak method

Strain antagonist	Test culture	Presence of inhibitory activity (+/-)	Strain antagonist	Test culture	Presence of inhibitory activity (+/-)
<i>Enterococcus</i> W1.1	W1.2 W1.3 M4.1 M5.2 <i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157	- - - - +	<i>Enterococcus</i> W1.5	W1.1 W1.2 W1.3 M4.1 M5.2 <i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157	+ + + - - +
<i>Enterococcus</i> W1.2	W1.1 W1.3 M4.1 M5.2 <i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157	- - - - +	<i>Enterococcus</i> W1.dc	W1.1 W1.2 W1.3 M4.1 M5.2 <i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157	+ + + + - +
<i>Enterococcus</i> W1.3	W1.1 W1.2 M4.1 M5.2 <i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157	- - - - +	<i>Enterococcus</i> M7.1	W1.1 W1.2 W1.3 M4.1 M5.2 <i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157	+ - + - - -
<i>Enterococcus</i> W1.4	W1.1 W1.2 W1.3 M4.1 M5.2 <i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157	- - + - + +	<i>Enterococcus</i> W2.3	W1.1 W1.2 W1.3 M4.1 M5.2 <i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157	- + + - - -



The *Enterococcus* M7.1 and *Enterococcus* W2.3 strains did not inhibit *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157, however, they showed inhibitory activity against other marine lactobacteria, that can also suggest the bacteriocin production. The other three producers – *Enterococcus* W1.4, *Enterococcus* W1.5, and *Enterococcus* W1.dc inhibited the growth of more than two test strains used in the work that can indicate a non-specific mechanism of antimicrobial action, such as production of organic acids (active non-specific antagonism). The *Enterococcus* M5.2 did not show an inhibitory activity against any of the test culture used in the work.

The composition of metabolic products of the studied LAB strains with antimicrobial properties will be studied by using chromatography-mass spectrometry. This is important for their further use in medical purposes or in aquaculture.

The new lactobacteria strains of the genera *Enterococcus* and *Lactobacillus* from water and mussels of the Black Sea were isolated and their basic tinctorial, morphological, and cultural properties were determined. It was established that representatives of lactobacteria group can be found in water of the Black Sea in winter time in low number that is $2 \times 10 - 4.8 \times 10^2$ CFU/mL. In tissue liquor of three mussels from seven, LAB were found in average number of $1.7 \times 10 \pm 0.7$ CFU/mL, which composed 0.0002 – 0.4% from their total microbiota. The strains *Enterococcus* W1.1, *Enterococcus* W1.2, *Enterococcus* W1.3, *Enterococcus* W2.3, *Enterococcus* M7.1 have a potential to produce antibacterial compounds.

**А. Г. Мерліч, О. Ю. Кальницька, М. В. Шутило,
О. О. Ковтун, В. О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +380964367403, e-mail: andriymerlich@gmail.com

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАКТОБАКТЕРІЙ З ВОДИ ТА МІДІЙ ЧОРНОГО МОРЯ З ПОТЕНЦІАЛОМ ДО ПРОДУКЦІЇ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ СПОЛУК

Реферат

Мета. Характеристика молочнокислих бактерій (МКБ) з води та мідій Чорного моря з потенціалом продукувати антибактеріальні сполуки. **Методи.** Виділення лактобактерій із води та мідій, їх підрахунок було виконано стандартними мікробіологічними методами. Визначення морфологічних, тинкторіальних, культуральних та біохімічних ознак проводили шляхом забарвлення за Грамом з імерсійною мікроскопією, описання росту в MRS бульйоні з 6,5% NaCl та без нього, проведення каталазного тесту. Для ідентифікації виділених бактерій використовували родоспецифічну класичну ПЛР. Для вивчення антагоністичної взаємодії штамів використовували метод перпендикулярних штрихів. **Результати.** У воді Чорного моря з Одеської затоки, зібраній у зимовий період, виявлено $2 \times 10 - 4,8 \times 10^2$ КУО/мл лактобактерій, тоді як лише у трьох мідіях із семи (42,9%) були знайдені МКБ ($1,7 \times 10 \pm 0,7$ КУО/мл). Виділено та охарактеризовано тринадцять но-



вих штамів лактобактерій – вісім штамів з води та п'ять з мідій. Серед них дев'ять штамів були ідентифіковані як *Enterococcus* sp., один штам – як *Lactobacillus* sp. та три штами залишилися неідентифікованими. Нові штами *Enterococcus* B1.1, *Enterococcus* B1.2, *Enterococcus* B1.3, *Enterococcus* B2.3 та *Enterococcus* M7.1 виявили антагоністичну активність щодо інших близькоспоріднених штамів та *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157.

Висновки. Чорноморська вода та тканинний ліквор мідій у зимовий період містять $2 \times 10 - 4,8 \times 10^2$ КУО/мл та $1,7 \times 10 \pm 0,7$ КУО/мл МКБ, відповідно. Штами *Enterococcus* B1.1, *Enterococcus* B1.2, *Enterococcus* B1.3, *Enterococcus* B2.3 та *Enterococcus* M7.1 є потенційними продуцентами антибактеріальних сполук.

Ключові слова: лактобактерії, вода Чорного моря, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, мідії, бактеріоцини.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Васильєва Н.Ю., Страшинова І.В., Басюл О.В., Ковтун І.О., Іваниця В.О. Стійкість до антибіотиків молочнокислих коків, ізольованих з чорноморських водоростей і мідій // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – № 49. – С. 8–19.
2. Кранга К.М., Васильєва Н.Ю., Страшинова І.В. Розподіл і мінливість чисельності гетеротрофних, коліморфних і молочнокислих бактерій у воді і гідробіонтах Чорного моря // Вісник Одеського національного університету. – 2019. – № 24. – С. 113–125.
3. Страшинова І.В., Ковтун І.О., Коротаєва Н.В. Характеристика молочнокислих бактерій губок Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – № 1. – С. 79–94.
4. Ямборко Г.В., Толіна М.Г. Виділення бактерій роду *Lactobacillus* від гідробіонтів Чорного моря та їх ідентифікація // Вісник ОНУ. Біологія. – 2006. – Т. 11, Вип. 6. – С. 215–220.
5. Amin M., Adams M.B., Burke Ch.M., Bolch Ch.J.S. Isolation and screening of lactic acid bacteria associated with the gastrointestinal tracts of abalone at various life stages for probiotic candidates // Aquaculture Reports. – 2020. – V. 17: 100378. – <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100378>
6. *Bergey's manual of systematic bacteriology. The Firmicutes* / Editors: P. De Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W.B. Whitman. – London; New York: Springer, 2009. – V. 3. – 1422 p.
7. Deasy B.M., Rea M.C., Fitzgerald G.F., Cogan T.M., Baresford T.P. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus* // Systematic and Applied Microbiology. – 2000. – V. 23 (4). – P. 510–522.
8. De Man J.C., Rogosa M., and Sharpe M.E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli* // J. Oppl. Bact. – 1960. – V. 23 (1). – P. 130–135.
9. Dubernet S., Desmasures N., Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level // FEMS Microbiology Letters. – 2002. – V. 214. – P. 271–275.



10. *Ibryamova S., Arhangelova N., Koynova T., Dimitrov D., Dimitrova Z., Ivanov R., Kalchev K., Chipev N., Natchev N., Ignatova-Ivanova T.* Antifungal activity of lactic acid bacteria, isolated from (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) in the bulgarian Black sea aquatory // Journal of IMAB – Annual Proceeding (Scientific Papers). – 2020. – V. 26 (1). – P. 2875–2882.
11. *Ignatova-Ivanova T., Ibryamova S., Bachvarova D., Salim S., Valkova S., Simeonova Y., Dimitrov D., Ivanov R., Chipev N., Natchev N.* Determination of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from the Black sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 // Pharmacia. – 2022. – V. 69 (3). – P. 637–644.
12. *Ignatova-Ivanova T., Ibrjmovs S., Stanachkova E., Ivanov R.* Microbiological characteristic of microflora of (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) in the Bulgarian Black Sea aquatory // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2018. – V. 9 (1). – P. 199–205.
13. *Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B.* Use of a genus and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci // Journal of Clinical Microbiology. – 2004. – V. 42(8). – P. 3558–3565.
14. *Kathiresan K., Thiruneelakandan G.* Prospects of lactic acid bacteria of marine origin // Indian Journal of Biotechnology. – 2008. – V. 7. – P. 170–177.
15. *Kwon H.S., Yang E.H., Yeon S.W., Kang B.H., Kim T.Y.* Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA // FEMS Microbiology Letters. – 2004. – V. 239. – P. 267–275.
16. *Layton B.A., Walters S.P., Lam L.H., Boehm A.B.* Enterococcus species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR // Journal of Applied Microbiology. – 2010. – V. 109. – P. 539–547.
17. *Merlich A., Galkin M., Choiset Y., Limanska N., Vasylieva N., Ivanytsia V., Haertlé T.* Characterization of the bacteriocin produced by *Enterococcus italicus* ONU547 isolated from Thai fermented cabbage // Folia Microbiol (Praha). – 2019. – V. 64(4). – P. 535–545.
18. *Nikita Ch., Hemangi D.* Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from dairy sludge sample // Journal of Environmental Research and Development. – 2012. – V. 7 (1A). – P. 1–11.
19. *Singh V., Haque Sh., Singh H., Verma J., Vibha K., Singh R., Jawed A., Tripathi C.K.M.* Isolation, screening, and identification of novel isolates of actinomycetes from India for antimicrobial applications // Front Microbiol. – 2016. – V. 7: 2016. – <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01921>
20. *Schmeisser C., Steele H., Streit W.R.* Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 75. – P. 955–962
21. *Szegedi E., Bottka S.* Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium // Vitis. – 2002. – V. 41(1). – P. 37–46.



REFERENCES

1. Vasylieva NYu, Strashnova IV, Basiul OV, Kovtun IO, Ivanytsia VO. Resistance of lactic cocci isolated from Black Sea algae and mussels to antibiotic. *Microbiology and Biotechnology*. 2020; (49): 8-19 (In Ukrainian).
2. Kranga KM, Vasylieva NYu, Strashnova IV. Distribution and variability of the heterotrophic, colimorphic and lactic acid bacteria number in water and aquatic organisms of the Black Sea. *Visnyk Odeskogo Natsionalnogo Universytetu. Biologiya*. 2019; (24): 113-125 (In Ukrainian).
3. Strashnova IV, Kovtun IO, Korotaeva NV. Characteristics of lactic acid bacteria from the Black Sea sponges. *Microbiology and Biotechnology*. 2020; (1): 79-94 (In Ukrainian).
4. Yamborko GV, Tolpina MG. Isolation *Lactobacillus* strains from gidrobionts of the Black Sea and their identification. *Visnyk Odeskogo Natsionalnogo Universytetu. Biologiya*. 2006; (11/6): 215-220 (In Ukrainian).
5. Amin M, Adams MB, Burke ChM, Bolch ChJS. Isolation and screening of lactic acid bacteria associated with the gastrointestinal tracts of abalone at various life stages for probiotic candidates. *Aquaculture Reports*. 2020; (17): 100378. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100378>
6. *Bergey's manual of systematic bacteriology. The Firmicutes* / Editors: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB. Springer, London, New York, 2009:3. 1422 p.
7. Deasy BM, Rea MC, Fitzgerald GF, Cogan TM, Baresford TP. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2000; (23 (4)):510-522.
8. Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*. 2002; 214: 271-275.
9. De Man JC, Rogosa M, and Sharpe ME. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Oppl. Bact.* 1960; (23 (1)): 130-135.
10. Ibryamova S, Arhangelova N, Koynova T, Dimitrov D, Dimitrova Z, Ivanov R, Kalchev K, Chipev N, Natchev N, Ignatova-Ivanova T. Antifungal activity of lactic acid bacteria, isolated from (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) in the bulgarian Black sea aquatory. *Journal of IMAB – Annual Proceeding (Scientific Papers)*. 2020; (26 (1)): 2875-2882.
11. Ignatova-Ivanova T, Ibryamova S, Stanachkova E, Ivanov R. Microbiological characteristic of microflora of (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) in the Bulgarian Black Sea aquatory. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2018; (9(1)): 199-205.
12. Ignatova-Ivanova T, Ibryamova S, Bachvarova D, Salim S, Valkova S, Simeonova Y, Dimitrov D, Ivanov R, Chipev N, Natchev N. Determination of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from the Black sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. *Pharmacia*. 2022; (69(3)): 637-644.
13. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; (42(8)): 3558-3565.



14. Kathiresan K, Thiruneelakandan G. Prospects of lactic acid bacteria of marine origin. *Indian Journal of Biotechnology*. 2008; 7: 170-177.
15. Kwon HS, Yang EH, Yeon SW, Kang BH, Kim TY. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*. 2004; 239: 267-275.
16. Layton BA, Walters SP, Lam LH, Boehm AB. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2010; 109: 539-547.
17. Merlich A, Galkin M, Choiset Y, Limanska N, Vasylieva N, Ivanytsia V, Haertlé T. Characterization of the bacteriocin produced by *Enterococcus italicus* ONU547 isolated from Thai fermented cabbage. *Folia Microbiol (Praha)*. 2019; (64(4)): 535-545.
18. Nikita Ch, Hemangi D. Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from dairy sludge sample. *Journal of Environmental Research and Development*. 2012; (7(1A)): 1 – 11.
19. Schmeisser C, Steele H, Streit WR. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2007; 75: 955-962
20. Singh V, Haque Sh, Singh H, Verma J, Vibha K, Singh R, Jawed A, Tripathi CKM. Isolation, screening, and identification of novel isolates of actinomycetes from India for antimicrobial applications. *Front Microbiol*. 2016; (7): 2016. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01921>
21. Szegedi E, Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium. *Vitis*. 2002; (41(1)): 37-46.

Стаття надійшла до редакції 15.08.2024 р.



I. V. Strashnova, A. K. Mashkova, G. V. Lisiutin, T. V. Ivanytsia

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

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM SPONGES *HALICLONA* SPP. ODESA BAY

The marine ecosystem is a promising source for discovering the producers of totally new bioactive compounds. Among the significant biodiversity, actinobacteria also are known by huge antagonistic potential. Aim. To study the antagonistic activity of actinobacteria isolated from marine sponges Haliclona spp. against the strains of indicator prokaryotic and eukaryotic microorganisms. Methods. Antagonistic activity of actinobacteria isolated from marine sponges Haliclona spp. against Staphylococcus aureus ATCC 25923, Micrococcus luteus ATCC 4698, Enterococcus faecalis ATCC 29212, Bacillus subtilis ATCC 6633, Kocuria rhizophila DSM 348, Escherichia coli ATCC 25922, Proteus vulgaris ATCC 6896, Salmonella enterica NCTC 6017, Klebsiella pneumoniae ATCC 10031, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Pseudomonas putida KT 2440 and Candida albicans ATCC 18804 were determined in vitro by the block method. Results. Thirteen from fourteen strains of actinobacteria inhibit the growth of at least one strain of the indicator microorganism. The most active strains of actinobacteria were Hal 2 and Hal 14, that significantly inhibit the growth of fifth strains of indicator microorganisms, the spectrum of which were differed. Strain Hal 2 has ability to inhibit the growth of S. aureus ATCC 25923, M. luteus ATCC 4698, E. faecalis ATCC 29212, K. rhizophila DSM 348, P. aeruginosa ATCC 27853 and C. albicans ATCC 18804, strain Hal 14 inhibit all Gram-positive bacteria, including B. subtilis ATCC 6633. K. rhizophila DSM 348, M. luteus ATCC 4698 and P. aeruginosa ATCC 27853 shown the impressive sensitivity to the studied strains of actinobacteria. The growth of P. aeruginosa was inhibited by ten strains of actinobacteria. Four strains of actinobacteria (Hal 2, Hal 4, Hal 5 and Hal 6) inhibit the growth of C. albicans ATCC 18804 with different intensity. All the indicators of the family Enterobacteriaceae and P. putida KT 2440 were resistant to the studied strains of actinobacteria. Conclusions. Strains of actinobacteria isolated from marine sponges Haliclona spp. inhibit the growth of indicator strains of prokaryotic and eukaryotic microorganisms. S. aureus ATCC 25923, M. luteus ATCC 4698, E. faecalis ATCC 29212, K. rhizophila DSM 348, P. aeruginosa ATCC 27853 and C. albicans ATCC 18804 are the most sensitive to the antagonistic action of actinobacteria. Strains of actinobacteria Hal 2, Hal 4 and Hal 14, which suppressed the ability to grow of the large quantity of indicator microorganisms with significant zones of inhibition of the growth, were chosen for further studies of the spectrum and properties of their secondary metabolites.

Key words: actinobacteria, antagonistic activity, indicator microorganisms, marine sponges Haliclona spp.



Discovering and “introduction” to the medical practice of new antibiotics and synthetic antibacterial and antiviral drugs remains one of the main problems of medicine, since infectious diseases occupy a leading place in human pathology [13]. Despite significant progress in medicine, diagnosis and treatment of infectious diseases, pathogenic microorganisms are still pose a serious threat to human health. This is happened due to the rapidly developing resistance to new antibiotics in the majority of both Gram-positive and Gram-negative pathogenic microorganisms [12]. Therefore, there is a problem of new antibiotic substances necessary to counteract and stop the spread of resistant pathogens. The strategy of creating new synthetic antibiotics by modifying existing natural ones does not “justify itself”: as occurs, the pathogenic microorganisms are quickly adapts to the new drugs [9]. A number of promising strategies for the searching the new antibiotic substances are connected with the use of metabolic products of marine microorganisms [15].

Actinobacteria plays a significant role in the production of various antimicrobial agents. Actinobacteria have an ability to synthesized a wide range of biologically active compounds with various chemical structures. Today, actinobacteria are the producers of more than 65% of the antibiotics used in pharmacology [7]. The most producers were isolated from terrestrial ecosystems, while actinobacteria, from marine sources, have not been sufficiently studied in this aspect. The marine environment conditions differ significantly from the terrestrial environment, and marine actinobacteria, they have characteristics that differ from the terrestrial representatives. Therefore, there is good reason to believe that they may produce compounds with different chemical structures and mechanisms of action [6, 12]. In recent years, there have been quite a lot of publications about studding the secondary metabolites activity of actinobacteria isolated from the marine environment [5, 6, 7, 8, 12].

The aim of this work was to study the antagonistic activity of actinobacteria isolated from marine sponges *Haliclona* spp. against the strains of indicator prokaryotic and eukaryotic microorganisms.

Materials and Methods

Fourteen strains of actinobacteria were studied of their antagonistic activity. The strains were isolated from marine sponges *Haliclona* spp. (Class *Demospongiae*, Order *Haplosclerida*, Family *Chalinidae*), collected using scuba gear at a depth of 5–6 m in the Odesa Bay of the Black Sea (46°27'01'' N 30°46'14'' E) at a distance of 300–400 m from the shore by a PhD Kovtun O. O. in 2022.

The antagonistic activity of actinobacteria against indicator strains of prokaryotic and eukaryotic microorganisms was determined *in vitro* by the block method, which is based on the ability of the producer's metabolites to diffuse into agar media and inhibit the growth of sensitive microorganisms [1].

Actinobacteria were grown on Gause2 agar medium in Petri dishes for 12 days at 30 °C. Indicator strains of Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kocuria rhizophila* DSM 348, Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas*



aeruginosa ATCC 27853, *Pseudomonas putida* KT 2440 and yeast-like fungus *Candida albicans* ATCC 18804 were used as test cultures. Indicator bacterial strains were grown in nutrient broth (GranuCult® Nutrient Broth, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at 37 °C, *Candida albicans* strain in liquid Sabouraud nutrient medium (NutriSelect® Plus Sabouraud-2% Dextrose Broth, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at 30 °C.

To prepare lawns of indicator microorganisms, 200 µl of daily culture (10^9 cells/ml) was added to 20 ml of molten semi-liquid medium nutrient agar (0.7% agar-agar) or, in the case of *C. albicans*, semi-liquid Sabouraud nutrient medium (with the same concentration of agar-agar), mixed and placed in a Petri dish. After solidification of the appropriate media with indicator microorganisms, agar blocks were cut from the 12-day cultures of actinobacteria and were placed on their surface. On each inoculated dish, 6 blocks of the studied actinobacteria were placed at the same distance from each other and from the edge of the Petri dish. As the controls the dishes inoculated with appropriate strains of indicator microorganisms without overlaying blocks with actinobacteria were used. The results were observing after cultivation at temperatures optimal for each group of microorganisms after 24 h (for bacteria) and 48 h (for *C. albicans*), every time checkoff the presence of inhibition zones of growth of the indicator strains [1, 2].

The experiment was carried out in triplicate. To analyze the results, descriptive statistics were carried out using the Microsoft Office Excel-2016 program.

Results and Discussion

One of the sources of new natural biologically active compounds can be sea sponges, which includes many microbes in their tissues. It is widely believed that a large number of bioactive compounds of sponges are the result of the joint action of symbiotic microorganisms, among which there are also actinobacteria [14].

The study of the antagonistic properties of 14 strains of actinobacteria (Hal 1 – Hal 14) isolated from sponges *Haliclona* spp., collected in the waters of the Odesa Bay of the Black Sea, showed that 13 studied strains inhibited the growth of at least one strain of indicator microorganisms. The growth of only one indicator microorganism was inhibited by 4 strains of actinobacteria, which accounted for 28.6% of all tested strains (Fig. 1).

Five (35.7%) strains prevented the growth of 3 indicators, two strains (14.3%) were the most active and prevented the growth of 5 strains of indicator microorganisms.

Not all studied strains of actinobacteria were equally active, which was visualized in the size of zones of no growth of sensitive indicator test-strains (Table).

As can be seen from the Table of the results, the sizes of the zones of inhibition of the growth of indicator microorganisms ranged from 11.3 ± 0.1 mm (under the influence of the Hal 13 strain on *S. aureus* ATCC 25923) to 27.4 ± 0.2 mm (under the influence of the Hal 2 strain on *P. aeruginosa* ATCC 27853).

The sizes of the zones of growth inhibition depended on the specific strain of both actinobacteria and the indicator microorganism. The most active against indicator microorganisms were Hal 2 and Hal 14 strains, which prevented the growth of 5 indicator microorganisms, the spectrum of which differed.



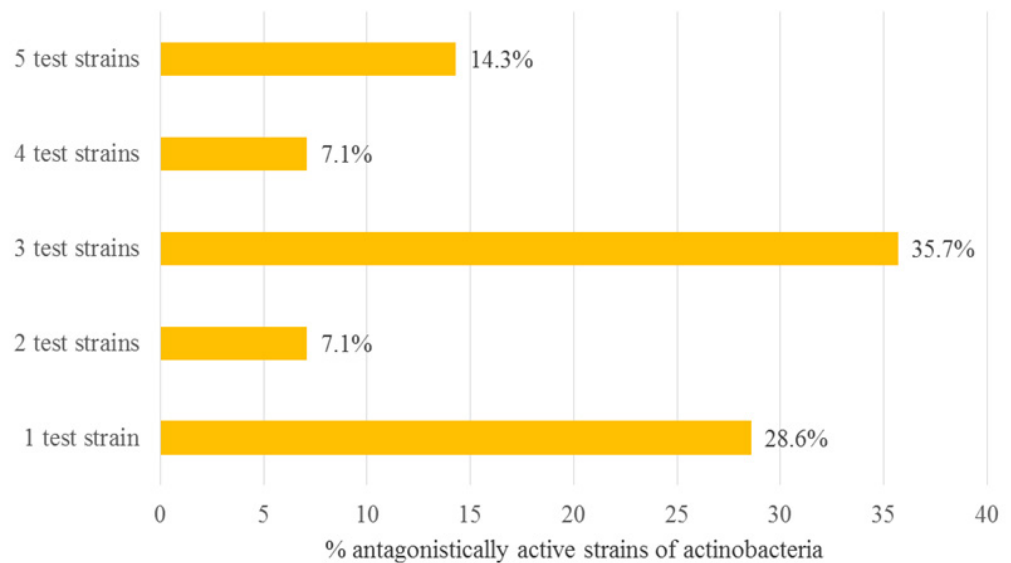


Fig. 1. The proportion of antagonistically active strains of actinobacteria isolated from marine sponges *Haliclona* spp.

So, if the Hal 2 strain suppressed the growth of Gram-positive (*S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 4698, *E. faecalis* ATCC 29212, *K. rhizophila* DSM 348), Gram-negative (*P. aeruginosa* ATCC 27853) bacteria and yeast-like fungus *C. albicans* ATCC 18804, the Hal 14 strain inhibited only Gram-positive bacteria, including *B. subtilis* ATCC 6633. In addition, the zones of no growth of sensitive strains of indicator microorganisms under the action of these two strains of actinobacteria exceeded 17.0 mm, that is, these strains are quite antagonistically active. In addition to strains Hal 2 and Hal 14, the strains Hal 13 and Hal 7 attract attention, which inhibited the growth of *S. aureus* ATCC 25923 and *E. faecalis* ATCC 29212, respectively, as well as the Hal 4 strain, which inhibited the growth of 4 indicator microorganisms, including *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *C. albicans* ATCC 18804.

Among the tested indicator microorganisms, *K. rhizophila* DSM 348, *M. luteus* ATCC 4698 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 manifested the greatest sensitivity, the growth of which was inhibited with varying intensity by more than half of the investigated actinobacteria strains (Fig. 2).

The most sensitive occurred strain *P. aeruginosa* ATCC 27853, the growth of which was inhibited by 10 strains of actinobacteria, and the zones of absence of its growth ranged from 13.2 ± 0.1 mm to 27.4 ± 0.2 mm (Table). And if the detected antagonistic activity of actinobacteria against Gram-positive bacteria is quite predictable and is confirmed by the results of many publications [10, 11], the high sensitivity of *P. aeruginosa* ATCC 27853 is to some extent an unexpected and encouraging result and may be indirectly may indicate the synthesis of new bioactive compounds by actinobacteria isolated from marine sponges. Our assumptions are confirmed in relevant publications. In particular, in their research, Goel N. et al. (2023) showed that secondary metabolites of a rare halophilic



Table
Zones of nongrowth of indicator microorganisms (mm) under the action of actinobacteria isolated from marine sponges *Haliciona* spp.

Strain of actinobacteria	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>K. rhizophila</i> DSM 348	<i>M. luteus</i> ATCC 4698	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 131	<i>P. vulgaris</i> ATCC 6896	<i>S. enterica</i> NCTC 6017	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. putida</i> KT 2440	<i>C. albicans</i> ATCC 18804
Hal 1	0	0	20.6±0.2	21.8±0.2	0	0	0	0	0	20.5±0.2	0	0
Hal 2	0	0	22.8±0.2	25.5±0.2	17.2±0.1	0	0	0	0	27.4±0.2	0	23.4±0.2
Hal 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24.5±0.2	0	0
Hal 4	0	0	16.2±0.2	22.1±0.2	0	0	0	0	0	18.5±0.1	0	23.2±0.2
Hal 5	0	0	0	13.7±0.1	0	0	0	0	0	17.3±0.2	0	18.4±0.1
Hal 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18.8±0.2	0	13.2±0.1
Hal 7	0	23.8±0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hal 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hal 9	0	0	11.4±0.1	19.2±0.1	0	0	0	0	0	24.5±0.2	0	0
Hal 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26.1±0.2	0	0
Hal 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25.9±0.2	0	0
Hal 12	0	0	18.8±0.1	24.7±0.2	0	0	0	0	0	13.2±0.1	0	0
Hal 13	0	0	20.2±0.2	19.4±0.1	11.3±0.1	0	0	0	0	0	0	0
Hal 14	19.6±0.2	20.9±0.3	24.6±0.2	27.0±0.2	19.5±0.1	0	0	0	0	0	0	0



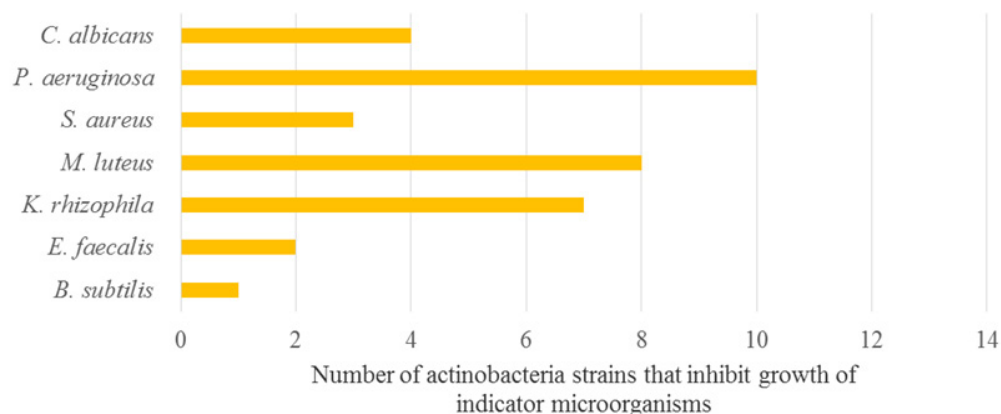


Fig. 2. The number of actinobacteria strains that shown the antagonistic effect against indicator microorganisms

actinobacterium, *Nocardiopsis lucentensis* EMB25, inhibited and destroyed biofilms of the *P. aeruginosa* PseA museum strain and clinical *P. aeruginosa* isolates [4]. The bioactivity of metabolites from actinobacteria isolated from the Red Sea against a wide range of microorganisms, including *P. aeruginosa* ATCC 9027, is discussed in the publication Osman M. E. et al. (2022) [10]. At the same time, another member of the family *Pseudomonadaceae*, *P. putida* KT 2440, was resistant to the investigated strains of actinobacteria. All representatives of the family *Enterobacteriaceae*, taken for the study, were also resistant (Table). Instead, the eukaryotic microorganism *C. albicans* ATCC 18804 turned out to be sensitive to the antagonistic action of actinobacterial strains Hal 2, Hal 4, Hal 5 and Hal 6. At the same time, the zones of absence of its growth due to the influence of strains Hal 2 and Hal 4 were quite large and amounted to 23.4 ± 0.2 mm and 23.2 ± 0.2 mm, respectively. Taking this into account, we can assume that there are the presence of metabolites with antibacterial and antifungal activities in the metabolic profile of the investigated strains of actinobacteria. The obtained data are combine with the results of Chakraborty B. et al. (2022), which detected significant antimicrobial activity in the *Streptomyces filamentosus* KS17 strain against a wide range of human pathogens, including *C. albicans*. This strain was isolated by the authors from a marine ecosystem in the Indian region [3]. In our previous studies on determining the antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the biological fouling of natural shell rock and mussels of the Odesa Bay of the Black Sea, their significant activity against a wide range of indicator microorganisms was also established, especially in strains isolated from mussels [2].

Thus, taking into account the obtained results, the following conclusions can be made:

1. The investigated strains of actinobacteria, isolated from marine sponges *Haliclona* spp., are antagonistically active against indicator strains of prokaryotic and eukaryotic microorganisms.



2. Indicator strains of Gram-positive bacteria, as well as *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *C. albicans* ATCC 18804, were most sensitive to the antagonistic effect of actinobacteria.

3. The most visualized antagonistic activity was identified in the strains of actinobacteria Hal 2, Hal 4 and Hal 14, which inhibited the growth of a large number of indicator microorganisms with significant zones of nongrowth. These three strains (Hal 2, Hal 4 and Hal 14) were chosen for further studies of the spectrum and properties of their secondary metabolites.

І. В. Страшнава, А. К. Машкова, Г. В. Лісютін, Т. В. Іваниця

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

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ АКТИНОБАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ГУБОК *HALICLONA* SPP. ОДЕСЬКОЇ ЗАТОКИ

Реферат

Морське середовище є перспективним джерелом для пошуку продуцентів нових біоактивних сполук. Серед значного біорізноманіття актинобактерій виділяються своїм метаболічним потенціалом. **Мета.** Дослідити антагоністичну активність актинобактерій, виділених із морських губок *Haliclona* spp., щодо штамів індикаторних прокариотичних і еукаріотичних мікроорганізмів. **Методи.** Антагоністичну активність актинобактерій, ізольованих з морських губок *Haliclona* spp. щодо *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kocuria rhizophila* DSM 348, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas putida* KT 2440 та *Candida albicans* ATCC 18804 визначали *in vitro* методом блоків. **Результати.** Тринадцять із 14 досліджених штамів актинобактерій пригнічували ріст хоча б одного штаму індикаторного мікроорганізму. Найбільш активними були штами актинобактерій Hal 2 and Hal 14, які значно пригнічували ріст 5 штамів індикаторних мікроорганізмів, спектр яких відрізнявся. Штам Hal 2 пригнічував ріст *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 4698, *E. faecalis* ATCC 29212, *K. rhizophila* DSM 348, *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *C. albicans* ATCC 18804, штам Hal 14 пригнічував усі грампозитивні бактерії, у тому числі *B. subtilis* ATCC 6633. Найбільшу чутливість до досліджених штамів актинобактерій виявили *K. rhizophila* DSM 348, *M. luteus* ATCC 4698 і *P. aeruginosa* ATCC 27853, ріст якого пригнічували 10 штамів актинобактерій. Чотири штами актинобактерій (Hal 2, Hal 4, Hal 5 та Hal 6) з різною інтенсивністю перешкоджали росту *C. albicans* ATCC 18804. Усі індикаторні представники родини *Enterobacteriaceae* та *P. putida* KT 2440 були нечутливі до дії досліджених штамів актинобактерій. **Висновки.** Штами актинобактерій, виділені із морських губок *Haliclona* sp., пригнічують ріст індикаторних штамів прокариотичних та еукаріотичних мікроорганізмів. *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 4698, *E. faecalis*



ATCC 29212, K. rhizophila DSM 348, P. aeruginosa ATCC 27853 і C. albicans ATCC 18804 є найбільш чутливими до антагоністичної дії актинобактерій. Штами актинобактерій Hal 2, Hal 4 і Hal 14, які пригнічували ріст великої кількості індикаторних мікроорганізмів зі значними зонами відсутності росту, відібрані для подальших досліджень спектру і властивостей їх вторинних метаболітів.

Ключові слова: актинобактерії, антагоністична активність, індикаторні мікроорганізми, морські губки Haliclona spp.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Громико О. Антагоністичні властивості актиноміцетів прикореневої зони маслини європейської *Olea europaea* L. // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2012. – Вип. 59. – С. 209–215. http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU_biol_2014_64_34.
2. Страшнова І.В., Потапенко К.С., Коротаєва Н.В., Лісютін Г.В., Метеліцина І.П. Антагоністична активність чорноморських стрептоміцетів, виділених із обростань черепашнику і мідій // Мікробіологія та біотехнологія. – 2022. – № 3 (56). – С. 6–23. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2022.3\(56\).268585](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2022.3(56).268585)
3. Chakraborty B., Kumar R.S., Almansour A.I., Perumal K., Nayaka S., Brindhadevi K. *Streptomyces filamentosus* strain KS17 isolated from microbiologically unexplored marine ecosystems exhibited a broad spectrum of antimicrobial activity against human pathogens // Process Biochemistry. – 2022. – V. 117. – P. 42–52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.03.010>
4. Goel N., Ghosh M., Jain D., Sinha R., Khare S.K. Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by secondary metabolites of *Nocardioopsis lucentensis* EMB25 // RSC Med. Chem. – 2023. – V. 14. – P. 745–756. doi: [10.1039/D2MD00439A](https://doi.org/10.1039/D2MD00439A)
5. Jagannathan S.V., Manemann E.M., Rowe S.E., Callender M.C., Soto W. Marine Actinomycetes, new sources of biotechnological products // Mar. Drugs. – 2021. – V. 19 (7). – 365. doi: <https://doi.org/10.3390/md19070365>
6. Joshua S.A., Sangeetha N., Iniyana A.M., Vincent S.G.P. Exploring antagonistic actinobacteria from a mangrove ecosystem of the southern coast of India against multidrug-resistant pathogens // Environmental and experimental biology. – 2021. – V. 19. – P. 255–263. doi: <http://doi.org/10.22364/eeb.19.24>
7. Lee L.-H., Chan K.-G., Stach J., Wellington E.M.H., Goh B.-H. Editorial: the search for biological active agent(s) from actinobacteria // Front Microbiol. – 2018. – V. 9. – 824. doi: [10.3389/fmicb.2018.00824](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00824)
8. McCauley E.P., Piña I.C., Thompson A.D., Bashir K., Weinberg M., Kurz S.L., Crews P. Highlights of marine natural products having parallel scaffolds found from marine-derived bacteria, sponges, and tunicates // J. Antibiot. – 2020. – V. 73. – P. 504–525. doi: <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0330-5>
9. Muteeb G., Rehman Md.T., Shahwan M., Aatif M. Origin of antibiotics and antibiotic resistance, and their impacts on drug development: a narrative review // Pharmaceuticals (Basel). – 2023. – V. 16 (11). – 1615. doi: [10.3390/ph16111615](https://doi.org/10.3390/ph16111615)



10. Osman M.E., El-Nasr A.A.A., Hussein H.M., Hamed M.M. Bioactivity of metabolites from actinomycetes isolates from Red Sea, Egypt // *Microbiol. Biotechnol. Lett.* – 2022. – V. 50 (2). – P. 255–269. doi: <https://doi.org/10.48022/mbl.2202.02003>
11. Pismel J.A.R., Fernandes C.F., Uesugi J.H.E., Coelho B.B.F., Prazeres M.C.C., Omura L.Y.E., Caldas D.S., Colares T.V., da Igreja M.A.F., Bezerra N.V. Evaluation of the antimicrobial potential of actinobacteria strains isolated from mangroves in the municipality of Bragança, Pará, Brazil // *International Journal of Development Research.* – 2023. – V. 13 (05). – P. 62827–62833. doi: <https://doi.org/10.37118/ijdr.26773.05.2023>
12. Ram V., Kumari K.S., Kurup R. Isolation and screening of actinomycetes from marine soil sediments and sponges for anti-microbial activities // *West Indian Med J.* – 2022. – V. 69 (8). – P. 571–577. doi: [10.7727/wimj.2016.194](https://doi.org/10.7727/wimj.2016.194)
13. Salam Md.A., Al-Amin Md.Y., Salam M.T., Pawar J.S., Akhter N., Rabaan A.A., Alqumber M.A.A. Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health // *Healthcare.* – 2023. – V. 11 (13). – P. 1946. doi: <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
14. Selim M.S.M., Abdelhamid S.A., Mohamed S.S. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes // *J Genet Eng Biotechnol.* – 2021. – V. 19. – P. 72. doi: <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>
15. Srinivasan R., Kannappan A., Shi C., Lin X. Marine bacterial secondary metabolites: a treasure house for structurally unique and effective antimicrobial compounds // *Mar Drugs.* – 2021. – V. 19 (10). – P. 530. doi: [10.3390/md19100530](https://doi.org/10.3390/md19100530)

REFERENCES

1. Gromyko O. Antagonistic properties of actinomycete from the ryzospere of *Olea europaea* L. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology.* 2012; 59: 209–215. [in Ukrainian].
2. Strashnova IV, Potapenko KS, Korotaeva NV, Lisyutin GV, Metelitsyna IP. Antagonistic activity of the Black Sea streptomycetes isolated from the fouling of shell rock and mussels. *Microbiology and biotechnology.* 2022; 3(56): 6–23. [in Ukrainian]. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2022.3\(56\).268585](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2022.3(56).268585)
3. Chakraborty B, Kumar RS, Almansour AI, Perumal K, Nayaka S, Brindhadevi K. *Streptomyces filamentosus* strain KS17 isolated from microbiologically unexplored marine ecosystems exhibited a broad spectrum of antimicrobial activity against human pathogens. *Process Biochemistry.* 2022; 117: 42–52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.03.010>
4. Goel N, Ghosh M, Jain D, Sinha R, Khare SK. Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by secondary metabolites of *Nocardioopsis lucentensis* EMB25. *RSC Med. Chem.* 2023; 14: 745–756. doi: [10.1039/D2MD00439A](https://doi.org/10.1039/D2MD00439A)
5. Jagannathan SV, Manemann EM, Rowe SE, Callender MC, Soto W. Marine Actinomycetes, new sources of biotechnological products. *Mar. Drugs.* 2021; 19(7): 365. doi: <https://doi.org/10.3390/md19070365>



6. Joshua SA, Sangeetha N, Iniyan AM, Vincent SGP. Exploring antagonistic actinobacteria from a mangrove ecosystem of the southern coast of India against multidrug-resistant pathogens. *Environmental and experimental biology*. 2021; 19: 255–263. doi: <http://doi.org/10.22364/eeb.19.24>
7. Lee L-H, Chan K-G, Stach J, Wellington EMH, Goh B-H. Editorial: the search for biological active agent(s) from actinobacteria. *Front Microbiol*. 2018; 9: 824. doi: [10.3389/fmicb.2018.00824](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00824)
8. McCauley EP, Piña IC, Thompson AD, Bashir K, Weinberg M, Kurz SL, Crews P. Highlights of marine natural products having parallel scaffolds found from marine-derived bacteria, sponges, and tunicates. *J. Antibiot*. 2020; 73: 504–525. doi: <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0330-5>
9. Muteeb G, Rehman MdT, Shahwan M, Aatif M. Origin of antibiotics and antibiotic resistance, and their impacts on drug development: a narrative review. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023; 16(11): 1615. doi: [10.3390/ph16111615](https://doi.org/10.3390/ph16111615)
10. Osman ME, El-Nasr AAA, Hussein HM, Hamed MM. Bioactivity of metabolites from actinomycetes isolates from Red Sea, Egypt. *Microbiol. Biotechnol. Lett*. 2022; 50(2): 255–269. doi: <https://doi.org/10.48022/mbl.2202.02003>
11. Pismel JAR, Fernandes CF, Uesugi JHE, Coelho BBF, Prazeres MCC, Omura LYE, Caldas DS, Colares TV, da Igreja MAF, Bezerra NV. Evaluation of the antimicrobial potential of actinobacteria strains isolated from mangroves in the municipality of Bragança, Pará, Brazil. *International Journal of Development Research*. 2023; 13(05): 62827–62833. doi: <https://doi.org/10.37118/ijdr.26773.05.2023>
12. Ram V, Kumari KS, Kurup R. Isolation and screening of actinomycetes from marine soil sediments and sponges for anti-microbial activities. *West Indian Med J*. 2022; 69(8): 571–577. doi: [10.7727/wimj.2016.194](https://doi.org/10.7727/wimj.2016.194)
13. Salam MdA, Al-Amin MdY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, Alqumber MAA. Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. *Healthcare*. 2023; 11(13): 1946. doi: <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
14. Selim MSM, Abdelhamid SA, Mohamed SS. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021; 19: 72. doi: <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>
15. Srinivasan R, Kannappan A, Shi C, Lin X. Marine bacterial secondary metabolites: a treasure house for structurally unique and effective antimicrobial compounds. *Mar Drugs*. 2021; V. 19(10): 530. doi: [10.3390/md19100530](https://doi.org/10.3390/md19100530)

Стаття надійшла до редакції 15.08.2024 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, діагностичні мікробні технології в сільському господарстві, мікробні технології у харчовій промисловості; захист та оздоровлення навколишнього середовища; отримання енергоносіїв та нових матеріалів тощо.

Мова (мови) видання: українська, 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 абрєвіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

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

Розділ «Матеріали і методи»:

- Методи дослідження та схеми експерименту мають бути представлені так, щоб їх можна було відтворити.
- Для використаних реактивів та матеріалів вказати назву компанії та країни-виробника.
- Одиниці вимірювання вказати в системі СІ.
- Концентрацію розчинів представляти в М, мМ, мкМ (молярна концентрація).
- 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 англійські 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. – 9th ed. – Baltimore; London, 1986. – Vol. 2. – 1599 p.

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

На журнальні статті

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

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 phtalate esters by micrococci // Arch. Microbiol. – 1982. – 132, № 2. – P. 185–188.

На тези доповідей

Мацелюх Б. П. Розробка біотехнології одержання ландоміцину E // 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-B92.

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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 GdYVO₄:Eu³⁺ 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, Djournanski A, Lambev H. Establishment of economically important viruses on *Echinacea purpurea* and their influence on the yield. In: Proceedings of the conference «Innovative aspects to coneflower study». Ed. Pospelov S. Poltava: Dyvosvit, 2013:36–45.



Yin R, Francis F, Bragard C, Liu Y, Chen J. Study on transmission efficiency of CMV transmitted by *Myzus persicae* from different places. In: Proceedings of 9th International Symposium on Aphids, Beijing, China. 2013:49–50.

Диссертационные работы:

Koreneva AA. Biological properties of medicinal plants viruses. PhD thesis, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2009: 22.

Сборники:

Dunich A, Mishchenko L. Heavy metals content in virus infected purple coneflower plants. Bull T Shevchenko Nat Univ Kyiv Ser Biol. 2013; 65(3):22–26.

Rose PI. Gelatin. In: Encyclopedia of polymer science and engineering Eds: Mark HF, Bikales NM, Overberger CG, Menges G, Kroschwitz JI New York: Wiley; 1987;7, 2nd ed. 488–513.

Shrago MI, Guchok MM, Kalugin YuV. Some principles of direct synthesis of cryoprotectants. In: Current Problems of Cryobiology. Eds. Pushkar NS and Belous AM. Kiev: Naukova Dumka, 1981:157–201.

Патенти, заявки:

A.s. 4411066/14 SSSR, MBI G 01 N 33/50. A method of determining bile acids in biological fluids. Veselskiy SP, Lyashchenko PS, Лукьяненко IA. (SSSR). – N 1624322; zayavl. 25.01.1988; opubl. 30.01.1991, Byul. N 4.

Статті з електронних журналів:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49–53, available at: www.ascusc.org/jcmc/vol5/issue2/

За наявності в статті DOI (Digital Object Identifier), яка є міжнародним ISO стандартом (<http://www.doi.org/>), в списку літератури бажано вказати її ідентифікатор, наприклад:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49–53. Cited 2 times. doi: 10.1134/S1023193508080077

Датою надходження статті вважають день, коли до редколегії надійшов перший варіант тексту статті.

Після одержання коректури статті автор повинен виправити лише помилки і терміново відіслати статтю на адресу редколегії або повідомити про свої правки по телефону чи електронною поштою.

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

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



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

Усі права захищені згідно законодавства України.

Верстка С. О. Остапенко

Підписано до друку 20.09.2024 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 6,83. Наклад 100 пр.
Зам. № 2875.

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