

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

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

Науковий журнал  
Виходить 4 рази на рік  
Засновано у липні 2006 року

№ 4(44)  
2018

Одеса  
ОНУ  
2018

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

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

**РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ**  
А. Анадон (Мадрид, Іспанія), Л. Д. Варбанець (Київ, Україна), А. І. Вінніков (Дніпропетровськ, Україна), Р. А. Волков (Чернівці, Україна), Б. М. Галкін (Одеса, Україна), А. Гаміан (Вроцлав, Польща), П. І. Гвоздяк (Київ, Україна), Т. Ертле (Нант, Франція), Г. О. Іутинська (Київ, Україна), Л. В. Капрельянц (Одеса, Україна), Н. К. Коваленко (Київ, Україна), І. К. Курдиш (Київ, Україна), Б. П. Мацелюх (Київ, Україна), І. П. Метеліцина (Одеса, Україна), Ф. Моцці (Тукуман, Аргентина), В. П. Пагика (Київ, Україна), Петров С. А. (Одеса, Україна), В. С. Підгорський (Київ, Україна), А. А. Сибірний (Львів, Україна), Л. М. Сківка (Київ, Україна), М. Я. Співак (Київ, Україна), І. А. Тихонович (Санкт-Петербург, Росія), Ф. І. Товкач (Київ, Україна), В. О. Федоренко (Київ, Україна), Н. Чанішвілі (Тбілісі, Грузія), С. В. Чеботар (Одеса, Україна)

**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

**Постановою Президії ВАК від 27.05.2009 № 1-05/2 журнал внесено до переліку наукових фахових видань України**

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

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

© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2018

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

**EDITOR-IN-CHIEF**

V. O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

**CO-EDITOR-IN-CHIEF**

T. O. Filipova (Odesa, Ukraine)

**EXECUTIVE SECRETARY**

T. V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

**EDITORIAL BOARD MEMBERS**

A. Anadon (Madrid, Espana), N. Chanishvili (Tbilisi, Geordgia), S. V. Chebotar (Odesa, Ukraine), V. O. Fedorenko (Kyiv, Ukraine), B. M. Galkin (Odesa, Ukraine), A. Gamian (Wroclaw, Poland), P. I. Gvozdyak (Kyiv, Ukraine), T. Haertle (Nantes, France), G. O. Iutynska (Kyiv, Ukraine), L. V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), N. K. Kovalenko (Kyiv, Ukraine), I. K. Kurdish (Kyiv, Ukraine), B. P. Matselyukh (Kyiv, Ukraine), I. P. Metelitsyna (Odesa, Ukraine), F. Mozzi (Tucuman, Argentina), V. P. Patyka (Kyiv, Ukraine), Petrov S. A. (Odesa, Ukraine), V. S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine), M. Ya. Spivak (Kyiv, Ukraine), A. A. Sybirny (Lviv, Ukraine), L. M. Skivka (Kyiv, Ukraine), I. A. Tykhonovych (St.-Peterburg, Russia), F. I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L. D. Varbanets (Kyiv, Ukraine), A. I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine), R. A. Volkov (Chernivtsi, Ukraine)

**Scientific editor V. O. Ivanytsia**

*Accepted for publishing articles are reviewed*

Approved for publishing by Academic Council  
of Odesa National Mechnykov University

**The journal was included to the list of Ukrainian scientific editions by the  
Presidium of High Attestation Commission (№ 1-05 /2 from 27.05.2009)**

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

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

Editors: L. B. Kotlyarova, I. V. Raiko

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

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

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

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

© Odesa National Mechnykov  
University, 2018

## ЗМІСТ

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

<b>В. С. Твердохліб, Н. В. Ліманська, К. Д. Крилова, В. О. Іваниця</b> ВПЛИВ БАКТЕРІЙ <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ОНУ 12 І <i>BACILLUS</i> <i>MEGATERIUM</i> ОНУ 484 НА ПРОРОСТАННЯ ТА РІСТ СІЯНЦІВ ПШЕНИЦІ .....	6
<b>Н. С. Верхоляк, Т. Б. Перетятко</b> МОРФОФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ СИСТЕМИ ОЧИЩЕННЯ СТІЧНИХ ВОД М. ЛЬВОВА .....	19
<b>Л. В. Титова, В. Г. Сергієнко</b> ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ЗАСТОСУВАННЯ МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ З ФУНГІЦИДАМИ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗАХВОРЮВАНЬ ТА ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКТИВНОСТІ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР .....	30
<b>М. А. Лопухова, О. Б. Паузер, І. П. Якуба, М. М. Артюх</b> ЯКІСТЬ СОКУ ТА ВИНА З ВИНОГРАДУ АРОМАТНИЙ ТА КАБЕРНЕ СОВІНЬЙОН ЗА ОБРОБКИ ЛОЗИ БІОПРЕПАРАТОМ АГРОМАР .....	42
<b>Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук, З. Я. Федорович, З. Д. Воробець</b> НО-СИНТАЗНА АКТИВНІСТЬ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА <i>ACNE VULGARIS</i> .....	51
<b>Н. Ю. Васильєва, К. Д. Крилова, Й. Б. Кристофферсен, О. А. Дубровіна, В. О. Іваниця</b> МІКРОБНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ ПРИБЕРЕЖНИХ ВОД ОДЕСЬКОЇ ЗАТОКИ ЧОРНОГО МОРЯ .....	63
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ .....	76

# CONTENTS

## EXPERIMENTAL WORKS

<b>V. S. Tverdokhlib, N. V. Limanska, K. D. Krylova, V. O. Ivanytsia</b> ABILITY OF <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ONU 12 AND <i>BACILLUS</i> <i>MEGATERIUM</i> ONU 484 TO STIMULATE GROWTH OF WHEAT SEEDLINGS AND TO FORM BIOFILMS .....	6
<b>N. S. Verkholiak, T. B. Peretyatko</b> MORPHOPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF SULFATE-REDUCING BACTERIA ISOLATED FROM THE SYSTEM OF LVIV WASTEWATER TREATMENT .....	19
<b>L. V. Tytova, V. G. Sergienko</b> THE EFFICIENCY OF THE COMPLEX USE OF MICROBIAL FORMULATIONS AND FUNGICIDES FOR THE DISEASES CONTROL AND PRODUCTIVITY INCREASE OF VEGETABLE CROPS .....	30
<b>M. A. Lopukhova, O. B. Pauzer, I. P. Yakuba, M. M. Artyukh</b> QUALITY OF JUICE AND WINE MADE OF GRAPE VARIETIES AROMATNY AND CABERNET SAUVIGNON AFTER TREATMENT OF VINES BY BIOPREPARATION AGROMAR .....	42
<b>G. Lavryk, O. Korniychuk, Z. Fedorovych, Z. Vorobets</b> NO-SYNTASE ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH <i>ACNE VULGARIS</i> .....	51
<b>N. Yu. Vasyleva, K. D. Krylova, J. B. Kristoffersen, O. A. Dubrovina, V. O. Ivanytsia</b> MICROBIAL DIVERSITY OF COASTAL WATERS OF ODESA BAY OF THE BLACK SEA .....	63
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS .....	76

V. S. Tverdokhlib, N. V. Limanska, K. D. Krylova, V. O. Ivanytsia

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

**ABILITY OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM*  
ONU 12 AND *BACILLUS MEGATERIUM* ONU 484  
TO STIMULATE GROWTH OF WHEAT SEEDLINGS  
AND TO FORM BIOFILMS**

*Development of biological preparations for organic agriculture should include the study of interactions of microorganisms – the components of biopreparations, with representatives of natural microbiota of agrocoenoses. As a microorganism – typical representative of epiphytic and soil microbiota, species Bacillus megaterium has been selected. Aim. The study of effect of Lactobacillus plantarum ONU 12 and Bacillus megaterium ONU 484 on germination and growth of wheat seedlings. Materials and Methods. Seeds of wheat Triticum aestivum L. were inoculated with suspensions of bacteria B. megaterium OHV 484, L. plantarum OHV 12 and their mixture was germinated in hydroponics and soil under green house conditions. Germination of seeds, mean length of roots and height of seedlings were compared. Capability of these microorganisms to form biofilms was studied: inoculated seedlings were dyed with 0.1% acridin orange and observed with a magnification x600. Results. Simultaneous inoculation with bacteria L. plantarum ONU 12 and with the representatives of soil microbiota B. megaterium ONU 484 didn't decrease the stimulation effect of lactobacilli. Opposite, the highest stimulation effect on plants both in hydroponics and in soil caused the treatments with the mixture L. plantarum ONU 12 + B. megaterium ONU 484 and with the strain B. megaterium ONU 484 alone. In hydroponics mean length of roots increased in 8.0 – 16.9%, mean height of seedlings – in 8.8 – 24.3%. In soil germination of seeds increased in 7.0%, mean height of seedlings – in 7.6%, mean root length – in 13.1%. Lactobacilli and bacilli in the mixture were able to form biofilms with a developed matrix. Conclusions. In presence of representative of soil microbiota B. megaterium ONU 484 phytostimulation the activity of lactobacilli increased. Strain B. megaterium ONU484 also showed stimulation activity when applied separately.*

**Key words:** stimulation of plant growth, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus megaterium*.

The development of biological preparations for organic agriculture should include the study of interactions of microorganisms from biological preparations with representatives of natural microbiota of agrocenoses. Lactobacilli isolated from plants are known for their stimulatory activity on plant growth [9; 10], which is explained by the synthesis of auxin hormones or their precursors described in



the literature [6]. It remains unclear whether the stimulatory effect of lactobacilli decreases when bacteria penetrate into the natural environment and interact with representatives of plant and soil microbiota. As a microorganism – a typical representative of the epiphytic and soil microbiota there were selected the species *Bacillus megaterium* in our study. The representatives of the genus *Bacillus* inhabit the surface and vessels of plants, as well as soil, and are known for their ability to stimulate plant growth [6; 8; 10; 13]. The phytostimulative activity of bacilli is explained by the possible synthesis of auxins, cytokinins, gibberellins and their precursors [8; 12; 13]. Gruneberg et al. (2006) indicate the successful application of the consortium of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus spp.* to improve the growth of ornamental plants. The previous studies described strains – representatives of the genera *Bacillus* and *Lactobacillus* with stimulatory activity for each strain separately [3; 9].

The aim of this work was to study the effect of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus megaterium* on germination and growth of wheat seedlings.

### Materials and methods

Strains from the Collection of the Department of Microbiology, Virology and Biotechnology of Odesa National I. I. Mechnikov University *L. plantarum* ONU 12 i *B. megaterium* ONU 484 were used. Lactobacilli were grown in a liquid MRS medium [5] at 37 °C overnight and used in the experiments with a culture concentration of 10<sup>8</sup> cells/ml. Bacilli were grown overnight in LB medium [4] at 28 °C. To prepare the mixture, bacteria of both strains were grown to the concentration of 10<sup>8</sup> CFU/ml, and mixed in a ratio of 1:1.

For simulating the conditions of hydroponics, we used the Aquasave S gel, prepared according to the instructions. As a test plant, *Triticum aestivum* L. (wheat variety – Kuialnik) was used. Seed surfaces were sterilized by 25% hydrogen peroxide for one minute. Then seeds were washed three times in sterile distilled water.

Overnight cultures of lactobacilli and bacilli at concentration of 10<sup>8</sup> cells/ml were used to prepare dilutions 1% (10<sup>7</sup> cells/ml), 0.1% (10<sup>6</sup> cells/ml), 0.01% (10<sup>5</sup> cells/ml), 0.001% (10<sup>4</sup> cells/ml), 0.0001% (10<sup>3</sup> cells/ml), 0.00001% (10<sup>2</sup> cells/ml) for each strain and for mixtures of strains. Seeds were soaked for one hour in each of the prepared dilutions. Subsequently, seeds were transferred in Aquasave S gel in glassware for germination. The control was seeds soaked for one hour in sterile distilled water. Germination was carried out in a greenhouse in Aquasave S gel for seven days.

With the concentrations of bacteria that exhibited the higher stimulatory activity we conducted the same experiment in soil conditions (Fig. 1). We used the soil "Poliskiy Universalniy" with a high content of peat, which was not sterilized before sowing.

In total in three independent experiments there were tested 300 seeds of each variants. After seven days, the growth characteristics of plants were measured: average lengths of the roots of seedlings and average height of the plant [2].

Statistical processing was performed using Excel package. The lengths of the roots and shoots as quantitative values were expressed as a mean and confidential



interval at 95%, the germination as a qualitative value was expressed as a percentage and a standard error. Significant differences between control measurements and inoculated seedlings were detected in Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

To study the ability of bacteria to form biofilms obtained wheat seedlings were washed from gel in distilled water. Biofilms were fixed in 96% ethanol for 15 min and stained with 0.1% solution of acridine orange for 10 minutes. The colored seedlings were dried on a slide and examined under a microscope. For observation, the microscope PrimoStar PC, Carl Zeiss with a total magnification x600 was used. The level of formation of biofilm was evaluated by the scale given in Table 1 [1].

Table 1

The evaluation criteria of the formation of biofilms [1]

Criteria	Description
–	Does not form biofilms
+	Individual attached cells without the formation of biofilms
++	Individual well-formed microcolonies
+++	Well-formed biofilms with gaps in the structure
++++	Well-formed biofilm with matrix

We investigated 10 samples of each variant and evaluated the level of biofilm formation in 10 fields of vision. The biofilms were photographed using the camera Canon EOS 500D.

### Results and Discussion

Inoculation of wheat seeds with bacteria of the strains *L. plantarum* ONU 12 and *B. megaterium* ONU 484 influenced germination and growth of seedlings in hydroponics conditions. Thus, treatment with bacilli at concentrations from 0.1% ( $10^6$  cells/ml) to 0.001% ( $10^4$  cells/ml) of the overnight cultures significantly increased the germination (Table 2).

Table 2

Germination of wheat in gel (%) after the treatments with *L. plantarum* ONU 12 and *B. megaterium* ONU 484 in different concentrations, cells/ml

Variant of treatment	Concentration, cells/ml				
	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$
<i>L. plantarum</i> ONU 12	65.0 ± 1.2	84.2 ± 1.0*	72.4 ± 1.3	67.1 ± 2.8	66.5 ± 1.2
<i>B. megaterium</i> ONU 484	40.0 ± 3.6	63.3 ± 3.6*	90.0 ± 2.2**	73.3 ± 3.3***	55.0 ± 2.6
<i>L. plantarum</i> 12 + <i>B. megaterium</i> 484	53.3 ± 3.7	60.0 ± 3.6	57.0 ± 3.6	57.0 ± 3.6	55.0 ± 2.6
Water (control)	55.0 ± 2.6%				

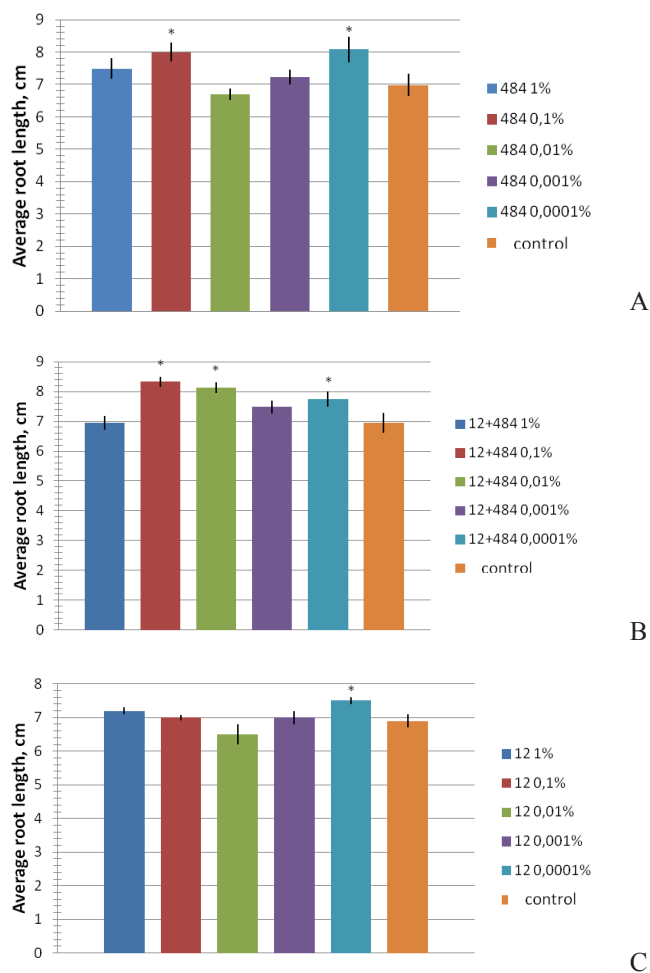
Note: the difference between the values is reliable at  $P = 0.05$ ; \* – compared with the corresponding indicator at concentration of  $10^7$  cells/ml; \*\* – at concentration of  $10^6$  cells/ml; \*\*\* – at concentration of  $10^5$  cells/ml; all values are significantly different from control.





In the control – seeds, soaked in water instead of the suspension of bacteria, the germination was  $55.0 \pm 2.6\%$ . We can see that low concentrations of bacteria ( $10^3$  cells/ml) did not influence the germination. A high concentration ( $10^7$  cells/ml) did not influence or even suppress germination, as in the case with *B. megaterium* ONU 484. Application of the individual strains was more effective than treatment with the mixture of strains *L. plantarum* ONU 12 and *B. megaterium* ONU 484 (Table 1). Treatment with lactobacilli improved the germination in 5.0–25.0%, bacilli – in 8.3–35.0% (except for the concentration of  $10^7$  cells/ml), and the mixture – in 1.7–5.0% (almost did not influence).

Measuring of the average length of the roots of seedlings showed that treatment of wheat seeds by suspensions of *B. megaterium* 484 increased root length in 8.0–14.8% (Fig. 1, A). In this case, the best concentrations were 0.1% ( $10^6$  cells/ml) and 0.0001% ( $10^3$  cells/ml) of *B. megaterium* 484 overnight cultures.



**Fig. 1. Average length of the roots of wheat seedlings treated with bacterial suspensions and germinated in gel:**

**A – *B. megaterium* ONU 484; B – *L. plantarum* ONU 12;**

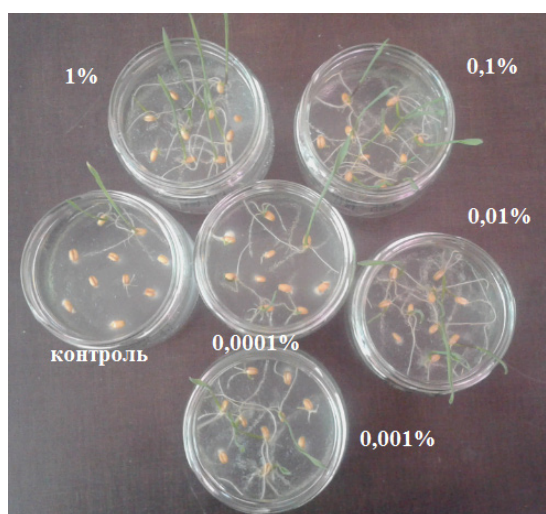
**C – *L. plantarum* ONU 12 + *B. megaterium* ONU 484,**

\* values are significantly different from the control ( $P < 0.05$ )



Treatment with lactobacilli increased the length of roots in 8.0% (Fig. 3, B). The average length of roots of seedlings after treatment with the mixture of lactobacilli and bacilli in gel increased in 8.0–17.0% (concentration of applied bacterial suspensions  $10^4$ – $10^6$  cells/ml) (Fig. 5). This means, that interaction with representatives of soil and plant microbiota – bacilli, did not decrease the stimulatory activity of lactobacilli. Opposite – their activity increased due to stimulatory effect of bacilli.

Figure 2 shows the wheat seedlings in gels after the treatment by the mixture of lactobacilli and bacilli.



**Fig. 2. Growth of root systems of wheat seedlings after the treatment with the mixture *L. plantarum* ONU 12 and *B. megaterium* ONU 484**

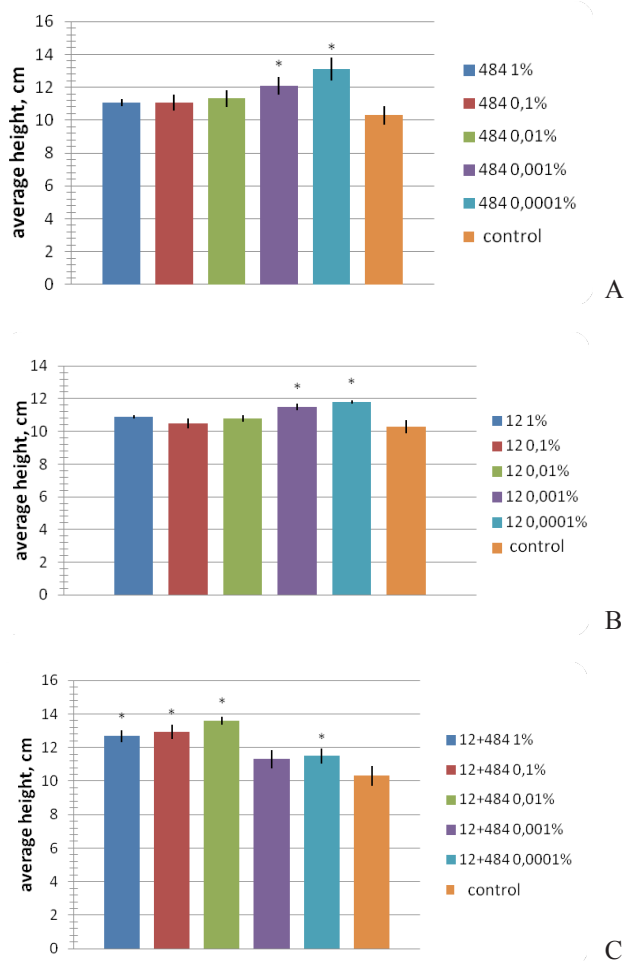
Bacterial suspensions caused more significant effect on the height of seedlings. Thus, treatment with strain *B. megaterium* 484 increased the average height of seedlings in 8.8–21.4% (for concentrations of applied bacterial suspensions  $10^3$ – $10^6$  cells/ml) (Fig. 3, A).

Treatment with lactobacilli increased the height of wheat seedlings in 10.4–12.7% ( $10^3$ – $10^4$  cells/ml) (Fig. 3, B). Treatments with the mixture also proved to be effective, increasing the height of seedlings in 8.8–24.3%, ( $10^3$ – $10^7$  cells/ml). When seeds were germinated in gel, treatment with the mixture of lactobacilli and bacilli was more effective than treatment with a separate strain of lactobacilli. Treatment by the strain *B. megaterium* ONU 484 also led to significant stimulation of plant growth. All concentrations caused positive effect, but application of the mixture was more effective at higher concentrations of bacteria ( $10^7$ – $10^5$  cells/ml), and use of bacteria of the strain *B. megaterium* ONU 484 individually could occur both at high concentrations ( $10^7$  cells/ml) and at less concentrations – from 0.01% – to 0.0001% concentrations of daily culture (from  $10^2$  to  $10^4$  cells/ml).

The phenomenon of enhancement of the properties of lactobacilli under the influence of another strain is known for the synthesis of bacteriocins, when the so-called strain-inducer intensified the synthesis of antagonistic compounds, and



the strain-inducer did not necessarily belong to the species *L. plantarum*, and not necessarily – to the genus *Lactobacillus*. This could be *Escherichia coli*, *Bacillus spp.* and others [11]. Perhaps this phenomenon is also known for the synthesis of plant growth hormones by lactobacilli. The enhancement of the stimulating activity of lactobacilli in the mixture is still not described in the literature, and therefore its mechanisms require further study.



**Fig. 3. Average height of wheat seedlings treated with bacterial suspensions and germinated in gel:**

**A – *B. megaterium* 484, B – *L. plantarum* ONU 12;**

**C – *L. plantarum* 12 + *B. megaterium* 484,**

\* values are significantly different from the control ( $P < 0.05$ )

We have carried out the experiments on germination of inoculated seeds in the soil with the concentrations of bacterial suspensions that had the best stimulating effect in gel. As it is shown in Table 3, the effect of inoculation with bacteria was not so significant as in gel.

Only bacteria *B. megaterium* 484 at concentration of 0.01% ( $10^5$  cells/ml) increased germination in 7% (in the control group germination reached 83.0%).



Table 3

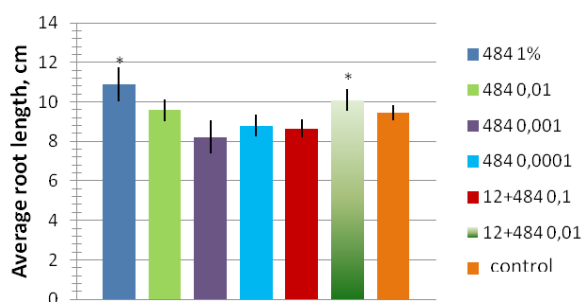
**Germination of wheat seeds in soil after the treatments with strains *L. plantarum* ONU 12 and *B. megaterium* ONU 484 at different concentrations, %**

Strain	Concentration, cells/ml	Germination
<i>B. megaterium</i> ONU 484	10 <sup>7</sup>	70.0±3.7
	10 <sup>5</sup>	90.0±2.4*
	10 <sup>3</sup>	88.0±2.6**
<i>L. plantarum</i> 12 + <i>B. megaterium</i> 484	10 <sup>6</sup>	83.0±3.1
	10 <sup>5</sup>	85.0±2.9

Note: \* Differences in comparison with the corresponding indicators, obtained at: \* – concentration of 1%; \*\* – concentration 0.001% (P = 0.05); all values are significantly different from the control.

Growth indices at some concentrations in soil were even less than in the control, that indicates that these concentrations were too high for application in soil (Fig. 4), in contrast to the growth conditions in gel.

Thus, the average length of roots of wheat seedlings increased in soil after the treatment with 1% (10<sup>7</sup> cells/ml) *B. megaterium* 484 and a mixture of *L. plantarum* 12 + *B. megaterium* 484 at concentration of 0.01% (10<sup>5</sup> cells/ml) – an increase in 6.3 – 13.1% occurred (Fig. 4).



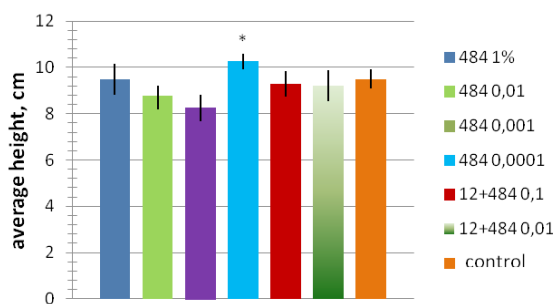
**Fig. 4. Average length of roots of wheat seedlings, inoculated by bacteria and germinated in soil:**

\* values are significantly different from the control (P < 0.05)

The most positive effect on average height of seedlings was caused by the suspension of 0.0001% (10<sup>3</sup> cells/ml) of the overnight culture of *B. megaterium* 484 – an increase of 7.6% occurred (Fig. 5).

So, for germination in soil more careful selection of bacterial concentrations for seed treatment was required. The length of roots and the height of the plants were better influenced by treatment with an individual strain *B. megaterium* 484, moreover, different concentrations caused a different effect on the growth of the roots and the aboveground parts. For increasing the length of the root higher concentrations of bacteria (10<sup>6</sup> cells/ml) are required, for increasing the height lower concentrations – 0.0001% (10<sup>3</sup> cells/ml) could be proposed.





**Fig. 5. Average height of wheat seedlings inoculated by bacteria and germinated in soil:**  
\* values significantly differ from the control ( $P < 0,05$ )

This coincides with the literature data: plant growth hormones, for example, auxin produced by bacilli [8] could stimulate or inhibit growth of various plant organs at different concentrations [7]. In our study, we have shown an increase in morphological characteristics of plants, which indicate the stimulation potential of the strains. The results indicate that germination of plants both in gel and in soil was most improved by bacteria of *B. megaterium* ONU 484 strain (an increase in germination of seedlings in 7.0–35.0%).

The height of seedlings and the length of roots, both in gel and in soil, were best influenced by the mixture of strains *L. plantarum* ONU 12 + *B. megaterium* ONU 484 and with bacteria *B. megaterium* ONU 484.

We gave studied the ability of bacteria to form biofilms on roots of seedlings germinated in gel with some concentrations that caused the best effect on growth characteristics.

Both individual strains and strains in the mixture were able to form biofilms on roots of wheat seedlings. Some of them were represented by individual microcolonies, another were well-formed biofilms without gaps in the structure (Table 4).

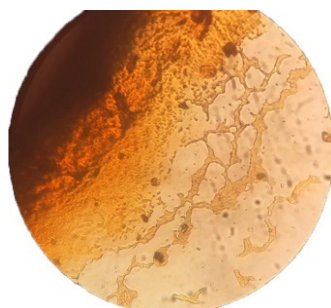
Table 4

**Level of biofilm formation on roots of wheat seedlings in hydroponics**

Inoculum bacteria	Concentration, cells/ml	Level of biofilm formation
<i>L. plantarum</i> ONU 12	$10^4$	+++
<i>L. plantarum</i> ONU 12	$10^3$	++
<i>B. megaterium</i> ONU 484	$10^6$	++++
<i>B. megaterium</i> ONU 484	$10^5$	+++
<i>B. megaterium</i> ONU 484	$10^4$	++
<i>B. megaterium</i> ONU 484	$10^3$	++
<i>L. plantarum</i> ONU 12 + <i>B. megaterium</i> ONU 484	$10^4$	++++
<i>L. plantarum</i> ONU 12 + <i>B. megaterium</i> ONU 484	$10^5$	++++
<i>L. plantarum</i> ONU 12 + <i>B. megaterium</i> ONU 484	$10^6$	++++
<i>L. plantarum</i> ONU 12 + <i>B. megaterium</i> ONU 484	$10^7$	++++

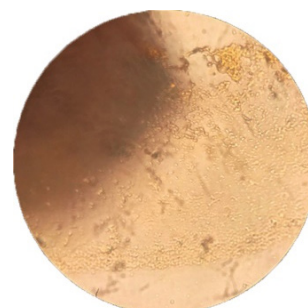


Well-formed biofilms were found on roots of the seedlings, which probably occurred due to lack of competition with other microbiota representatives and the compact gel structure that contributes to adhesion of bacteria (Figure 6).



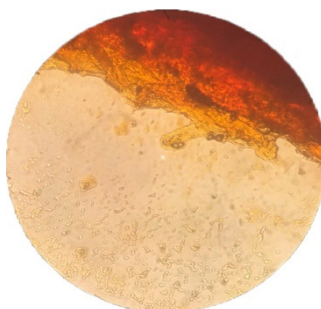
*B. megaterium* ONU 484 0.1%  
("++++")

A formed biofilm with a well-developed matrix



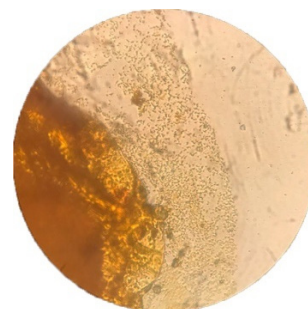
*L. plantarum* ONU 12 +  
*B. megaterium* ONU 484 0.1% ("++++")

A formed biofilm with a well-developed matrix



*B. megaterium* ONU 484 0.0001%  
("++")

Biofilm is represented by individual entirely formed microcolonies



*L. plantarum* ONU 12 +  
*B. megaterium* ONU 484 0.01% ("++++")

A formed biofilm with a well-developed matrix

**Fig. 6. Biofilms of *B. megaterium* 484 and the mixture of *L. plantarum* ONU 12 and *B. megaterium* ONU 484 on roots of wheat seedlings (600x)**

*L. plantarum* ONU 12 and *B. megaterium* 484 in the mixture formed a biofilm with a well-developed matrix regardless of the primary concentration of bacteria in inoculum. Instead, in case of the treatment with the strain *B. megaterium* 484, the level of biofilm formation depended on the concentration of bacteria and increased when higher concentrations of bacteria were applied.

The obtained results indicate that the investigated microorganisms are able to attach to roots of the seedlings, survive and form biofilms.

### Conclusion

In presence of a representative of soil microbiota *B. megaterium* ONU 484 stimulation activity of lactobacilli from biological preparation increased. Strain *B. megaterium* ONU484 also showed stimulation activity when applied separately.





**В. С. Твердохліб, Н. В. Ліманська, К. Д. Крилова,  
В. О. Іваниця**

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

## **ВПЛИВ БАКТЕРІЙ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ОНУ 12 І *BACILLUS MEGATERIUM* ОНУ 484 НА ПРОРОСТАННЯ ТА РІСТ СІЯНЦІВ ПШЕНИЦІ**

### **Реферат**

Створення біологічних препаратів для органічного землеробства має включати дослідження взаємодій мікроорганізмів – складових біопрепаратів, з представниками природньої мікробіоти агроценозів. У якості мікроорганізму – типового представника епіфітної і ґрунтової мікробіоти нами було обрано вид *Bacillus megaterium*. **Мета.** Вивчення впливу бактерій штамів *Lactobacillus plantarum* ОНУ 12 і *Bacillus megaterium* ОНУ 484 на проростання і ріст сіянців пшениці. **Матеріали і методи досліджень.** Було проведено дослідження стимулюючих властивостей бацил штаму *B. megaterium* ОНУ 484, лактобацил штаму *L. plantarum* ОНУ 12 та їх суміші, та здатність даних мікроорганізмів до формування біоплівки. **Результати дослідження.** Показано, що за сумісної інокуляції бактеріями біологічного препарату *L. plantarum* ОНУ 12 та представником ґрунтової мікробіоти *B. megaterium* ОНУ 484 зменшення стимуляційного впливу не відбувалося. Навпаки, найбільш стимулюючий вплив на ріст рослин як в умовах гідропоніки, так і у ґрунті чинили обробки сумішшю *L. plantarum* ОНУ 12 + *B. megaterium* ОНУ 484 та окремим штамом *B. megaterium* ОНУ 484. У гелі середня довжина кореня сіянців збільшувалась на 8,0–16,9%, а середня висота сіянців – на 8,8–24,3%. В умовах ґрунту схожість насіння підвищувалася на 7,0%, середня висота сіянців – на 7,6%, а середня довжина кореня – на 13,1%. На корінцях пшениці лактобацили і бацили у суміші були здатними утворювати сформовану біоплівку з добре розвинутим матриксом. **Висновки.** За присутності представника мікробіоти ґрунту *B. megaterium* ОНУ 484 стимуляційні властивості лактобацил біопрепарату підвищувалися. Штам *B. megaterium* ОНУ 484 сам по собі виявився активним стимулятором росту рослин.

**Ключові слова:** стимуляція росту рослин, мікроорганізми зі стимулювальною активністю.



**В. С. Твердохлеб, Н. В. Лиманская, К. Д. Крылова,  
В. А. Иваныця**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса 65082, Украина  
e-mail: limanska@onu.edu.ua

## **ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ОНУ12 И *BACILLUS MEGATERIUM* ОНУ484 НА ПРОРАСТАНИЕ И РОСТ СЕЯНЦЕВ ПШЕНИЦЫ**

### **Реферат**

Создание биологических препаратов для органического земледелия должно включать исследование взаимодействий микроорганизмов – составных био-препаратов, с представителями микробиоты агроценозов. В качестве микроорганизма – типичного представителя эпифитной и почвенной микробиоты нами было избрано вид *Bacillus megaterium*. **Цель.** Изучение влияния бактерий штаммов *Lactobacillus plantarum* ОНУ 12 и *Bacillus megaterium* ОНУ 484 на прорастание и рост сеянцев пшеницы. **Материалы и методы исследования.** Было проведено исследование стимулирующих свойств ба-цилл штамма *B. megaterium* ОНУ 484, лактобацилл штамма *L. plantarum* ОНУ 12 и их смеси, и способность данных микроорганизмов к формированию биопленок. **Результаты исследования.** Показано, что при совместной инокуляции бактериями биологического препарата *L. plantarum* ОНУ 12 и представителем почвенной микробиоты *B. megaterium* ОНУ 484 уменьшения стимулирующего влияния не происходило. Наоборот, наибольшее стимулирующее влияние на рост растений как в условиях гидропоники, так и в почве вызывали обработки смесью *L. plantarum* ОНУ 12 + *B. megaterium* ОНУ 484 и отдельным штаммом *B. megaterium* ОНУ 484. В геле средняя длина корня сеянцев увеличивалась на 8,0–16,9%, а средняя высота сеянцев – на 8,8–24,3%. В условиях почвы всхожесть семян увеличивалась на 7,0%, средняя высота сеянцев – на 7,6%, а средняя длина корня – на 13,1%. На корнях пшеницы лактобациллы и бациллы в смеси были способными образовывать сформированную биопленку с хорошо развитым матриксом. **Выводы.** В присутствии представителя микробиоты почвы *B. megaterium* ОНУ 484 стимуляционные свойства лактобацилл биопрепарата повышались. Штамм *B. megaterium* ОНУ 484 сам по себе выявился активным стимулятором роста растений.

**Ключевые слова:** стимуляция роста растений, микроорганизмы со стимулирующей активностью.

### **Literature**

1. Галкін М. Б., Ліманська Н. В., Філіпова Т. О., Іваниця В. О. Формування біоплівки бактеріями *Lactobacillus plantarum* на коренях рослин *Lepidium sativum* L. // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 3. – С. 34–43.
2. ДСТУ 4138-2002 Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. – К.: Держспоживстандарт України, 2003. – 170 с.
3. Мерліч А. Г., Ліманська Н. В., Жунько І. Д., Бабенко Д. О. Вплив *Lactobacillus plantarum* і *Bacillus atrophaeus* на проростання насіння та ріст





проростків пшениці // Мікробіологія та біотехнологія. – 2017. – № 1(37). – С. 36–47.

4. Bertani, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phageliberation by lysogenic *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1951. – P. 293–300.

5. De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J Appl Bacteriol – 1960 – № 23. – P. 130–135.

6. Goffin P., de Bunt B., Giovane M., Leveaue J.H.J., Hoppener-Ogawa S., Teusink B., Hugenholtz J. Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth // Molecular Systems Biology. – 2010. – Vol. 6, № 431. doi: 10.1038/msb.2010.67.

7. Gruneberg H., Oschmann C., Dunya S., Ulrich C. Improving green roofs and rail road greening systems using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* // Communications in agricultural and applied biological sciences. – 2006. – Vol. 72. – P. 121–130.

8. Kilian M., Steiner U., Krebs B., Junge H., Schmeiedeknecht G., Hain R. FZB24 *Bacillus subtilis* – mode of action of microbial agent enhancing plant vitality // Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. – 2000. – V. 1. – P. 72–93.

9. Limanska N. V., Sokolova N. V., Sudak A. A., Galkin M. B., Ivanytsia V. O. Effect of *Lactobacillus plantarum* on growth characteristics of wheat in hydroponics and soil // Microbiology and Biotechnology. – 2018. – № 3(43). – P. 36–49.

10. Narasimha M., Malini M., Savitha J. and Srinivas C. Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstoniasolanacearum* // Pest Management in Horticultural Ecosystems. – 2012. – V. 18, № 1. – P. 60–65.

11. Rojo-Bezares B., Saenz Y., Navarro L., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grapemust // Food Microbiol. – 2007. – Vol. 24. – P. 482–491.

12. Wang S., Huijun W., Junging Q., Lingli M., Jun L., Yanfei X., Xuwen Gao. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance by tobacco mosaic virus by *Bacillus spp.* // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2009. – 19. – P. 1250–1258.

13. Zou C., Li Z., Yu D. *Bacillus megaterium* XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran // J. Microbiol. – 2010. – V. 48. – P. 460–466.

## References

1. Galkin MB, Limanska NV, Filipova TO, Ivanytsia VO. Biofilm formation by *Lactobacillus plantarum* bacteria on *Lepidium sativum* L. roots. Microbiology and Biotechnology. 2012. 3:34–43.

2. DSTU 4138-2002 Seeds of agricultural plants. Methods of testing the quality. 2003. Kyiv: Derzhpozhyvstandart Ukraini: 170.

3. Merlich AG, Limanska NV, Zhunko ID, Babenko DO. Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus atropheauson* germination of wheat seeds and seedlings growth. Microbiology and Biotechnology. 2017. 1: 36 – 47

4. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1951. 62: 293–300.

5. de Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of



*lactobacilli*. J Appl Bacteriol. 1960. 23:130–135.

6. Goffin P, de Bunt B, Giovane M, Leveaue JHJ, Hoppener-Ogawa S, Teusink B, Hugenholtz J. Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth. Molecular Systems Biology. 2010. 6:431. doi: 10.1038/msb.2010.67.

7. Gruneberg H, Oschmann C, Dunya S, Ulrich C. Improving green roofs and rail road greening systems using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*. Communications in agricultural and applied biological sciences. 2006. 72: 121–130.

8. Kilian M, Steiner U, Krebs B, Junge H, Schmeiedeknecht G, Hain R. FZB24 *Bacillus subtilis* – mode of action of microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. 2000. 1: 72–93.

9. Limanska NV, Sokolova NV, Sudak AA, Galkin MB, Ivanytsia VO. Effect of *Lactobacillus plantarum* on growth characteristics of wheat in hydroponics and soil. Microbiology and Biotechnology. 2018. 3(43): 36–49.

10. Narasimha M, Malini M, Savitha J, Srinivas C. Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstoniasolanacearum*. Pest Management in Horticultural Ecosystems. 2012. 18: 60–65.

11. Rojo-Bezares B, Saenz Y, Navarro L, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. Food Microbiol. 2007. 24: 482–491.

12. Wang S, Huijun W, Junging Q, Lingli M, Jun L, Yanfei X, Xuewen Gao. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance by tobacco mosaic virus by *Bacillus spp*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009. 19: 1250–1258.

13. Zou C, Li Z, Yu D. *Bacillus megaterium* XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. J. Microbiol. 2010. 48: 460–466.

Стаття надійшла до редакції 23.10.2018 р.



**Н. С. Верхоляк, Т. Б. Перетятко**

Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, тел.: +38 (032) 239 40 53,  
e-mail: nataljaverkholjak@gmail.com

## **МОРФОФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ СИСТЕМИ ОЧИЩЕННЯ СТІЧНИХ ВОД М. ЛЬВОВА**

**Мета:** виділити сульфатвідновлювальні бактерії з системи очищення стічних вод міста Львова, дослідити морфологічні та фізіологічні властивості виділених мікроорганізмів. **Методи.** Об'єктом дослідження був штам сульфатвідновлювальних бактерій, виділений з системи очищення побутових та промислових стічних вод міста Львова. Проби води та мулу відбирали з первинного, вторинного відстійників і активного мулу системи очищення стічних вод міста Львова методом Столбунова-Рябова. Бактерії виділеного штаму культивували на селективному середовищі. Ідентифікацію виділеного штаму мікроорганізмів проводили за морфофізіологічними ознаками згідно визначника Берджі. Морфологію досліджуваної культури вивчали електронномікроскопічно. Для визначення наявності спор в клітинах їх забарвлювали за методом Пешкова. Вміст сульфат-йону та гідроген сульфід у культуральній рідині визначали фотометрично. **Результати.** Із активного мулу аеротенку системи очисних споруд міста Львова виділено штаму спороутворювальних сульфатвідновлювальних бактерій, який також за відсутності сульфат-йону може використовувати елементарну сірку як кінцевий акцептор електронів. За наявності сульфат-йону бактерії використовують лактат та ацетат як джерела карбону. Мікроорганізми мають форму коротких паличок, за Грамом забарвлюються негативно. Виділений штаму бактерій належить до нейтрофільних, мезофільних мікроорганізмів. За морфологічними і фізіологічними властивостями виділений штаму ідентифікований як *Desulfotomaculum* AR1. **Висновки.** Сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfotomaculum* AR1, виділені з мулу аеротенку системи очищення стічних вод м. Львова нагромаджують до 18 мМ гідроген сульфід за наявності у середовищі лактату чи ацетату як джерела карбону. Крім сульфат-йонів бактерії відновлюють елементарну сірку, використовуючи її як кінцевий акцептор електронів.

**Ключові слова:** сульфатвідновлювальні бактерії, гідроген сульфід, дисиміляційна сульфатредукція, стічні води.

Сульфатвідновлювальні бактерії широко поширені в природі і впливають на біогеохімічні цикли карбону, сульфуру та металів у водному і ґрунтовому середовищах [9]. Вони здійснюють дисиміляційне відновлення сульфат-йонів і зв'язують потоки карбону і сульфуру в анаеробних біотопах, що



містять оксоаніони сульфуру. Сульфатвідновлювальні бактерії використовують сульфат-йон як кінцевий акцептор електронів і отримують енергію для росту внаслідок окиснення органічних речовин або молекулярного водню [15]. Продукт життєдіяльності сульфатвідновлювальних бактерій – гідроген сульфід – може взаємодіяти з йонами важких металів, утворюючи нерозчинні сульфіди металів, або відновлювати розчинні токсичні йони металів з утворенням менш токсичних чи менш розчинних форм [9].

За участю сірко- та сульфатвідновлювальних бактерій відбувається осадження і міграція важких металів у водоймах та їх залучення в глобальні біогеохімічні цикли. Утворений у процесі сульфатного дихання гідроген сульфід може відновлювати йони важких металів зі змінною валентністю (Cu (II), Cd (II), Ni (II), Pb (IV), Cr (VI) та інші) та осаджувати їх [9, 14].

Стічні води міста Львова через систему каналізаційних колекторів і насосних станцій надходять на каналізаційні очисні споруди, де здійснюється їхнє механічне і біологічне очищення, після чого воду скидають в ріку Полтву, а одержану густу фракцію вивозять на мулові майданчики [7].

У процесі біологічного очищення промислових і побутових стічних вод вирішальну роль відіграють мікроорганізми. З літератури відомо про важливу роль сульфатвідновлювальних бактерій у цих процесах. Сульфатвідновлювальні бактерії за анаеробних умов забезпечують повне вилучення йонів важких металів з одночасним очищенням від органічних речовин [2].

В основу технології використання сульфатвідновлювальних бактерій для осадження йонів металів з промислових стічних вод покладено принцип стимулювання розвитку сульфатвідновлювальних бактерій за анаеробних умов збагаченням середовища доступними для них органічними речовинами. З цією метою переважальним є використання дешевих, характерних для певного виробництва органічних сполук (барди, меляси, парафінів нафти тощо) [5].

Негативним наслідком діяльності сульфатвідновлювальних бактерій у системі очищення стоків є їх здатність індукувати корозію металевих конструкцій очисних споруд та водогонів. Найбільше на корозію металу в підземному середовищі впливають бактерії циклу сірки – тіонові та сульфатвідновлювальні. З їх діяльністю пов'язане утворення самородної сірки, сульфідних родовищ, сірководневих вод, а також виникнення корозійно небезпечних ситуацій. Нерідко масштаби утворення і накопичення сірчаної кислоти, сірководню та елементної сірки біогенного походження настільки великі, що корозійну активність бактерій циклу сірки можна розглядати як один із видів їх геохімічної діяльності [6]. Це питання також є актуальною проблемою сьогодення.

Метою роботи було виділити сульфатвідновлювальні бактерії з системи очищення стічних вод міста Львова, дослідити їх морфологічні та фізіологічні властивості.

### **Матеріали та методи**

Штами сульфатвідновлювальних бактерій виділяли з системи очищення побутових та промислових стічних вод міста Львова. Проби води та мулу



для виявлення і виділення з них сульфатвідновлювальних бактерій відбирали з води первинного, вторинного відстійників і активного мулу аеротенку системи очищення стічних вод м. Львова методом Столбунова-Рябова [1]. Розведені проби води та мулу вносили в пробірки, повністю заливали лактатним середовищем такого складу (г/л): дріжджовий екстракт – 1, натрій лактат – 4, амоній хлорид – 0,5, калій гідрофосфат – 1,0, магній сульфат гептагідрат – 0,2, кальцій хлорид дигідрат – 0,1, ферум (II) сульфат гептагідрат – 0,1, натрій сульфат – 0,5 [13] та культивували у термостаті за температури 30 °С протягом 15 діб. Далі проводили багаторазові пересіви на середовище Постгейта В [15].

Із виділених штамів, подальші дослідження проводили зі штамом сульфатвідновлювальних бактерій, здатним до спороутворення.

Для культивування виділеного штаму бактерій, дослідження його фізіологічних властивостей використовували середовище Постгейта С [15] та модифіковане середовище Постгейта С (без сульфат-йонів) з елементною сіркою (1 г/л).

У процесі виділення штаму сульфатвідновлювальних бактерій проводили мікроскопічний контроль чистоти культури (світловий мікроскоп,  $\times 1600$ ).

Для створення анаеробних умов, виділений штам сульфатвідновлювальних бактерій культивували у пробірках об'ємом 20 мл без контакту середовища з повітрям. Для підтвердження відсутності кисню використовували індикатори анаеробного стану (Oxoid, Англія).

Вміст сульфат-йонів визначали турбідиметрично після їхнього осадження барій хлоридом. Для стабілізації суспензії використовували гліцерин [4]. Кількість гідроген сульфід у культуральній рідині фотометрично з використанням *n*-амінодиметиланілін дигідрохлориду [16].

Для визначення оптимальних температури росту та кислотності середовища бактерії культивували у пробірках з рідким середовищем Постгейта С за різних значень температур (4–65 °С) та рН (0–12).

Біомасу бактерій визначали за мутністю суспензії клітин фотометруванням на фотоелектроколориметрі КФК–3 ( $\lambda=340$  нм, кювета 3 мм).

Ідентифікацію виділеного штаму сульфатвідновлювальних бактерій проводили за морфофізіологічними ознаками згідно визначника Берджі [8].

Для визначення здатності виділеного штаму бактерій утворювати спори, суспензію клітин прогрівали на водяній бані за температури 80 °С, після чого її висівали на агаризоване середовище та культивували за анаеробних умов. Для визначення наявності спор в клітинах їх додатково забарвлювали за методом Пешкова [13].

Морфологію бактерій досліджували за допомогою сканувальної електронної мікроскопії з використанням СЕМ JEOL T220A у лабораторії фізичних методів дослідження кафедри фізики Землі Львівського національного університету імені Івана Франка. Поверхню зразків напилували тонким шаром срібла у вакуумному напилувачі ВУП-5. Прискорювальна напруга становила 25 кВ [12].

Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням програми „Microsoft Excel”. Результати представлені як середнє значення з поправкою на стандартну похибку ( $M\pm m$ ).





### Результати та їх обговорення

Для виділення сульфатвідновлювальних бактерій із системи очищення стічних вод м. Львова, проби води та мулу, відібрані з різних ланок системи очищення стічних вод, а саме – з первинного, вторинного відстійників та активного мулу, висівали у лактатне середовище. Після цього методом серійних розведень здійснювали багаторазові пересіви на середовище Постгейта В. У результаті відновлення бактеріями сульфат-іонів утворюється водень сульфід, який, взаємодіючи з йонами феруму (II), утворює осад чорного кольору, що вказує на наявність сульфатвідновлювальних бактерій.

Кількість сульфатвідновлювальних бактерій на різних етапах системи очищення стоків міста коливається в різних межах. В первинному відстійнику та активному мулі їх титр складає  $1 \times 10^2$  КУО/мл, а у аеротенку –  $4 \times 10^2$  КУО/мл, тоді як у вторинному відстійнику їх не виявлено [11].

Здатність до дисиміляційної сульфатредукції, у результаті чого у середовищі нагромаджується водень сульфід вказує на те, що виділені бактерії згідно визначника Берджі належать до групи 7 – Бактерії, що здійснюють дисиміляційне відновлення сульфату або сірки. Загальними властивостями цих бактерій, що об'єднують їх в єдину еколого-трофічну групу, є чіткий анаеробіоз і здатність до дисиміляційного відновлення сульфат-іонів.

Виділений штам сульфатвідновлювальних бактерій має вигляд коротких паличок розміром  $1,0 \times 1,5$  мкм (рис. 1). За Грамом виділені мікроорганізми забарвлюються негативно, анаероби.

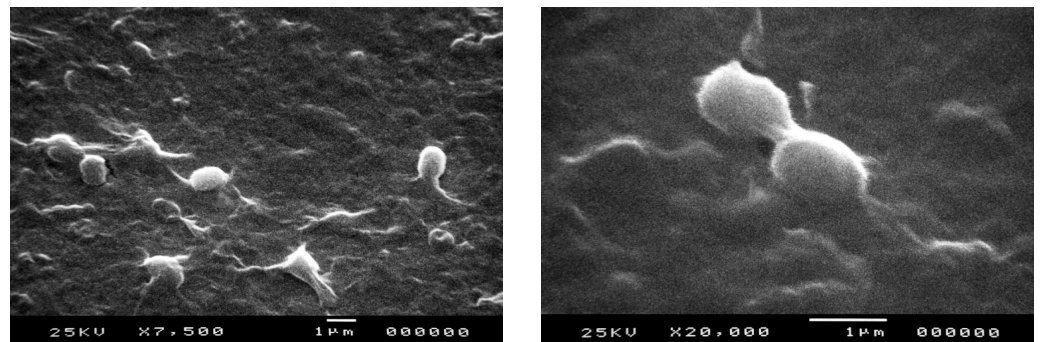


Рис. 1. Сульфатвідновлювальні бактерії штаму, виділеного з активного мулу очисних споруд м. Львова (сканувальна електронна мікроскопія,  $\times 7\,500$ ;  $\times 20\,000$ )

Fig. 1. Sulfate-reducing bacteria of strain, isolated from active sludge of the system of sewage treatment in Lviv (scanning electron microscopy,  $\times 7,500$ ;  $\times 20,000$ )

Для визначення оптимальних температури і рН виділений штам бактерій культивували у селективному середовищі Постгейта С за різних температур та рН. Виділений штам належить до мезофільних та нейтрофільних мікроорганізмів, з оптимальними температурою росту  $25\text{--}37$  °С та рН  $6,0\text{--}7,5$  (табл. 1).

Систематика сульфатвідновлювальних бактерій згідно визначника Берджі [8] базується на морфологічних, фізіологічних та біохімічних власти-

востях мікроорганізмів. До першої підгрупи 7 групи визначника Берджі належать сульфатвідновлювальні бактерії, здатні до спороутворення – це бактерії роду *Desulfotomaculum*. До трьох інших підгруп належать неспороутворювальні бактерії. Друга підгрупа об'єднує сульфатвідновлювальних бактерій, які здійснюють неповне окиснення органічних субстратів. До третьої підгрупи належать бактерії, що окиснюють субстрати до CO<sub>2</sub>. Четверта підгрупа об'єднує роди сульфатвідновлювальних бактерій, представники яких, крім сульфат-йонів, здатні відновлювати елементну сірку [8].

Таблиця 1

**Характеристика ізольованого штаму сульфатвідновлювальних бактерій**

Table 1

**Characteristics of the isolated strain of sulfate-reducing bacteria**

Здатність до спороутворення		так
Забарвлення за Грамом		грамнегативні
Ріст за температури	4–20 °C	–
	25–37 °C	+
	45–65 °C	–
Ріст за pH	2,0–5,5	–
	6,0–7,5	+
	8,0–12,0	–
Повне окиснення органічних субстратів		+
Акцептори електронів	сульфат-йон	+
	сірка	+
Донори електронів	ацетат	+
	лактат	+

Примітка: “–” – відсутність росту; “+” – наявність росту

Note: “–” – absence of growth; “+” – presence of growth

Щоб з'ясувати до якої групи належить виділений штам сульфатвідновлювальних бактерій, їх висівали у середовище Постгейта С з додаванням натрій лактату та натрій ацетату. Акцепторами електронів були сульфат-йон та елементна сірка.

За культивування штаму бактерій, виділеного з активного мулу аеротенку, у середовищі з натрій лактатом і сульфат-йоном (30 мМ) бактерії нагромадили близько 3 г/л біомаси (рис. 2, а). За цих умов концентрація сульфат-йону знизилася вдвічі, а у середовищі виявлено 14 мМ гідроген сульфід. Під час культивування виділених мікроорганізмів у середовищі Постгейта С з натрій ацетатом (рис. 2, б), біомаса бактерій становила 3,4 г/л. У культуральному середовищі за цих умов виявлено 18 мМ гідроген сульфід.

Одним із основних факторів, який обмежує ріст *D. desulfuricans* Ya-11 за наявності в середовищі донорів і акцепторів електронів є гідроген сульфід [10]. Різні мікроорганізми виявляють різну чутливість до гідроген сульфід у середовищі. Згідно з даними літератури, найстійкішими до гідроген сульфід



є дріжджі *P. guilliermondii*, а найбільш чутливими – *D. desulfuricans* [3]. У мікроорганізмів за пригнічувальних концентрацій гідроген сульфід спостерігається дезорганізація клітинної стінки, зміни в мембранних структурах і нагромадження сульфідів, які викликають зміни у структурі цитоплазми. Всі перелічені зміни у клітині можуть призвести до загибелі бактерій [3].

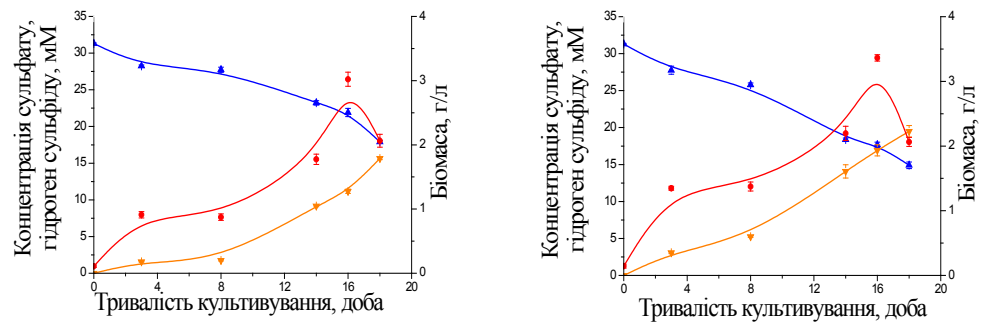


Рис. 2. Нагромадження біомаси (—●—), гідроген сульфід (—▼—) та використання сульфату (—▲—) штамом сульфатвідновлювальних бактерій, виділеним з активного мулу аеротенку системи очищення стічних вод міста Львова, у середовищі з натрій лактатом (а) та натрій ацетатом (б) як джерелами карбону

Fig. 2. Accumulation of biomass (—●—), hydrogen sulfide (—▼—) and the utilization of sulfate (—▲—) by strain of sulfate-reducing bacteria, isolated from active sludge of aerotanks of wastewater treatment system of Lviv, in the medium with sodium lactate (a) and sodium acetate (b) as a carbon source

Виділений штам є більш стійким до підвищених концентрацій гідроген сульфід, порівняно з іншими видами сульфатвідновлювальних бактерій. Ріст бактерій *D. desulfuricans* Ya-11 повністю пригнічувався за наявності 6 мМ сульфід у середовищі. Додавання сульфід у концентраціях 6,3 і 9,4 мМ до середовища культивування бактерій, що перебували у логарифмічній фазі росту, призводило до повного припинення росту культури [10].

Перевірка здатності бактерій виділеного штаму утворювати спори дала позитивні результати. Згідно визначника бактерій Берджі, серед сульфатвідновлювальних бактерій утворювати спори можуть представники роду *Desulfotomaculum*.

Крім сульфат-йону, як акцептор електронів сульфатвідновлювальні бактерії родів *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfomonas*, *Desulfovibrio* ін. можуть використовувати елементну сірку [8]. За культивування сульфатвідновлювальних бактерій виділеного штаму у модифікованому середовищі Постгейта С з додаванням елементної сірки, встановлено, що вони можуть використовувати елементну сірку за відсутності сульфат-йонів. Біомаса за таких умов становила 3,2 г/л (рис. 3).

Отже, згідно проведених досліджень здатності використовувати сульфат-йони, нагромаджувати гідроген сульфід, засвоювати різні органічні сполуки, морфологічних ознак, здатності до спороутворення дають змогу ідентифікувати виділений штам сульфатвідновлювальних бактерій як *Desulfotomaculum* AR1.





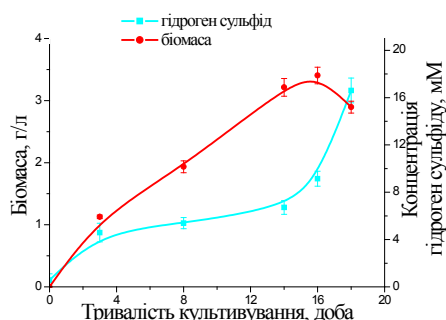


Рис. 3. Ріст та сульфідогенна активність сульфатвідновлювальних бактерій виділеного штаму у середовищі Постгейта С з елементною сіркою як акцептором електронів

Fig. 3. Growth and sulfidogenic activity of sulfate-reducing bacteria of isolated strain in Posgate C medium with elemental sulfur as an electron acceptor

Сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfotomaculum* AR1, виділені з мулу аеротенку системи очищення стічних вод м. Львова нагромаджують до 18 мМ гідроген сульфід за наявності у середовищі лактату чи ацетату як джерела карбону. Крім сульфат-йонів бактерії відновлюють елементну сірку, використовуючи її як кінцевий акцептор електронів.

Здатність бактерій *Desulfotomaculum* AR1 використовувати сульфат-йони та елементну сірку дає змогу вважати їх перспективними для очищення стічних вод від  $S^0$  і  $SO_4^{2-}$ , а їх здатність до спороутворення забезпечує більшу стійкість і виживання за умов неконтрольованого скиду забруднених стоків.

**Н. С. Верхоляк, Т. Б. Перетятко**

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,  
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел.: +38 (032) 239 40 53,  
e-mail: nataljaverkholjak@gmail.com

## МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СИСТЕМЫ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД Г. ЛЬВОВА

### Реферат

**Цель:** выделить сульфатредуцирующие бактерии из системы очистки сточных вод города Львова, исследовать морфологические и физиологические свойства выделенных микроорганизмов. **Методы.** Объектом исследования был штамм сульфатредуцирующих бактерий, выделенный из системы очистки бытовых и промышленных сточных вод города Львова. Пробы воды и ила отбирали из первичного, вторичного отстойников и активного ила системы очистки сточных вод города Львова методом Столбунова-Рябова. Выделенный штамм бактерий культивировали на селективной среде. Идентификацию выделенного штамма микроорганизмов проводили по мор-



фoфизиологическим признакам согласно определителя Берджи. Морфологию исследуемых культур изучали электронно-микроскопическим методом. Для определения наличия спор в клетках их красили по методу Пешкова. Содержание сульфат-иона и сероводорода в культуральной жидкости определяли фотометрическим методом. **Результаты.** Из активного ила аэротенка системы очистных сооружений города Львова выделено штамм спорообразующих сульфатредуцирующих бактерий, который также при отсутствии сульфат-иона может использовать элементную серу в качестве конечного акцептора электронов. При наличии сульфат-иона бактерии используют лактат и ацетат в качестве источника углерода. Микроорганизмы имеют форму коротких палочек. По Граму окрашиваются отрицательно. Выделенный штамм бактерий относится к нейтрофильным и мезофильным микроорганизмам. По морфологическим и физиологическим свойствам выделенный штамм идентифицирован как *Desulfotomaculum AR1*. **Выводы.** Сульфатредуцирующие бактерии *Desulfotomaculum AR1*, выделенные из ила аэротенка системы очистки сточных вод города Львова накапливают до 18 ммоль сероводорода при наличии в среде лактата или ацетата как источника углерода. Кроме сульфат-ионов бактерии восстанавливают элементную серу, используя ее в качестве конечного акцептора электронов.

**Ключевые слова:** сульфатредуцирующие бактерии, сероводород, диссульфидная сульфатредукция, сточные воды.

**N. S. Verkholiak, T. B. Peretyatko**

Ivan Franko National University of Lviv,  
4, Hrushevsky str., Lviv, 79005, Ukraine, tel.: +38 (032) 239 40 53,  
e-mail: nataljaverkholjak@gmail.com

## MORPHOPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF SULFATE-REDUCING BACTERIA ISOLATED FROM THE SYSTEM OF LVIV WASTEWATER TREATMENT

### Summary

**Aim:** to isolate the sulfate-reducing bacteria from the system of sewage treatment in the city of Lviv, to study the morphological and physiological properties of isolated microorganisms. **Methods.** The research object was a strain of sulfate-reducing bacteria, isolated from the system of treatment the domestic and industrial wastewater of the city of Lviv. Water and sludge samples were taken from the primary, secondary settlers and active sludge of the wastewater treatment system of the city of Lviv by the Stolbinov-Ryabov method. The isolated strain of bacteria was cultivated on a selective medium. Identification of the isolated strain of microorganisms was carried out according to morphophysiological features in accordance with the Bergey's manual. The morphology of the studied cultures was studied by electron microscopy. To determine the presence of spores in the cells, they were stained by the method of Peshkov. The content of sulfate and hydrogen sulfide in the culture liquid was determined photometrically. **Results.** From active sludge of the aerotank system of the treatment facilities of the city of Lviv allocated a strain of spore-forming sulfate-reducing bacteria, which also, in the absence of sulfate-ion, can use elemental sulfur as a final electron acceptor. In the presence of sulfate ion bacteria use lactate and acetate as a source of carbon. Microorganisms



are in the form of short rods, Gram-negative. The isolated strain of bacteria belongs to neutrophilic and mesophilic microorganisms. The isolated strain is identified as *Desulfotomaculum* AR1 by the morphological and physiological properties.

**Conclusions.** Sulfate-reducing bacteria *Desulfotomaculum* AR1, isolated from active sludge of aerotanks of the wastewater treatment system in the city of Lviv, accumulate up to 18 mM hydrogen sulfide in the presence of lactate or acetate in the medium as a source of carbon. In addition to sulfate ions, bacteria reduce elemental sulfur, using it as a final electron acceptor.

**Key words:** sulfate-reducing bacteria, hydrogen sulfide, dissimilatory sulfate reduction, sewage.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Антупчук А. Ф., Кіреєва І. Ю. Водна мікробіологія. – К.: Кондор, 2005. – 254 с.
2. Буракаєва Д., Русанов А., Лантух В. Методическое пособие. Роль микроорганизмов в очистке сточных вод от тяжелых металлов. – Оренбург, 1999. – 53 с.
3. Галушка А. А., Гудзь С. П. Структурно-функціональні зміни в клітинах мікроорганізмів при дії гідроген сульфідом // Біологічні студії. – 2009. – Т. 3, № 2. – С. 141–148.
4. ГОСТ 26426-85. Почвы. Метод определения ионов сульфата в водной вытяжке. М.: Изд-во стандартов, 1985. – С. 43–46.
5. Илялетдинов А. Н., Алиева Р. М. Микробиология и биотехнология очистки промышленных сточных вод. – Алма-Ата: Гылым. – 1990. – 250 с.
6. Козлова І., Коптєва Ж., Заніна В., Пуріш Л. Мікробна корозія як прояв техногенезу у біоплівці, що формується на поверхні підземних споруд // Фізико-хімічна механіка матеріалів – 2010. – № 3. – С. 98–107.
7. Оліферчук В. П., Матвієнко М. Т., Войтович І. Г. Можливість використання осаду стічних вод очисних споруд Львова для виробництва біогазу // Науковий вісник НЛТУ. – 2009. – Вип. 19.9. – С. 72–76.
8. *Определитель бактерий Берджи* / Под ред. Дж. Хоулта, Р. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
9. Перетятко Т. Б., Галушка А. А., Гудзь С. П. Використання металів як кінцевих акцепторів електронів сульфатвідновлювальними бактеріями // Біологічні студії. – 2009. – Том 3, № 3 – С. 131–148.
10. Перетятко Т. Б., Гнатуш С. О., Гудзь С. П. Утворення сульфідом *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 за різних умов культивування // Вісник Львів. ун-ту. Серія біол. – 2007. – 43. – С. 180–184.
11. Шоляк К. В., Перетятко Т. Б., Гудзь С. П. Поширення хромрезистентних мікроорганізмів у стічних водах // Агроєкологічний журнал. – 2013. – № 3. – С. 81–85.
12. Bergmans L., Moisiadis P., Van Meerbeek B., Quirynen M., Lambrechts P. Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM // International Endodontic Journal, 2005. – 38. – P. 775–788.
13. Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. Methods for General and Molecular Bacteriology. – American Society for Microbiology, 1994. – 791 p.



14. Hussain A., Hasan A., Javid A., Qazi J. I. Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review // 3 Biotech. – 2016. – 6:119. [https://doi.org/10.1007/s13205-016-0437-3]
15. Postgate J. R. The sulfate-reducing bacteria. 2<sup>nd</sup> ed. – Cambridge: Cambridge Univ. press, 1984. – 199 p.
16. Sugiyama M. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide. United States Patent N 6340596, 2002.

### References

1. Antipchuk AF, Kireeva IY. Water microbiology. K.:Condor; 2005. 254 p. (in Ukrainian).
2. Burakayeva D, Rusanov A, Lantukh V. Methodical manual. The role of microorganisms in the purification of sewage from heavy metals. Orenburg; 1999. 53 p. (in Russian).
3. Halushka AA, Gudz SP. Structural and functional changes in the cells of microorganisms under the influence of hydrogen sulfide. *Studia Biologica*. 2009; 3(2):141–148. (in Ukrainian).
4. GOST 26426-85. Soils. Method of sulfate ions in an aqueous extract determination. Moscow: Publishing House of Standards. 1985; 43–46. (in Russian).
5. Ilyaletdinov AN, Alieva RM. Microbiology and biotechnology of industrial wastewater treatment. Alma-Ata: Gylim; 1990. 250 p. (in Russian).
6. Kozlova I, Kopteva Zh, Zanina V, Purish L. Microbial corrosion as a manifestation of technogenesis in biofilms formed on surfaces of underground structures. *Physicochemical Mechanics of Materials*. 2010; 3:98–107. (in Ukrainian).
7. Oliferchuk VP, Matvienko MT, Voytovich IG. Flow waters sediment use possibilities of Lviv's sewage disposal plant for biogas production. *Scientific Bulletin of NUFWT of Ukraine*. 2009; 19.9:72–76. (in Ukrainian).
8. Hoult J, Krieg R, Snit P, Staley J, Williams S. Bergey's manual of systematic bacteriology. Moscow: Mir; 1997. 432 p. (in Russian).
9. Peretyatko TB, Halushka AA, Gudz SP. Usage of metals as the terminal electron acceptors by the sulfatereducing bacteria. *Studia Biologica*. 2009; 3(3): 131–148. (in Ukrainian).
10. Peretyatko T, Hnatush S, Gudz S. The creation of sulfide by *Desulfovibrio desulfuricans* YA-11 in differen cultivation conditions. *Visnyk of L'viv univ. Biology series*. 2007; 43:180–184. (in Ukrainian).
11. Sholyak KV, Peretyatko TB, Gudz SP. Distribution of chromium-resistant microorganisms in sewage. *Agroecological Journal*. 2013; 3:81–85. (in Ukrainian).
12. Bergmans L, Moisiadis P, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *International Endodontic Journal*. 2005; 38: 775–788.
13. Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR. Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology; 1994. 791 p.
14. Hussain A, Hasan A, Javid A, Qazi JI. Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a



mini review. 3 Biotech. 2016; 6:119.

15. Postgate JR. The sulfate-reducing bacteria. 2nd ed. Cambridge: Cambridge Univ. press; 1984. 199 p.

16. Sugiyama M. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide. United States Patent N 6340596. 2002.

Стаття надійшла до редакції 17.06.2018 р.



УДК 632.937+632.952:632.4

**Л. В. Титова<sup>1</sup>, В. Г. Сергієнко<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,  
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143,  
тел.: +38(044) 526 34 87, e-mail: ltytova.07@gmail.com

<sup>2</sup> Інститут захисту рослин НААН України, вул. Васильківська, 33, Київ, 03022,  
тел.: +38(044) 257 11 24, e-mail: vg\_sergienko@bigmir.net

## **ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ЗАСТОСУВАННЯ МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ З ФУНГІЦИДАМИ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗАХВОРЮВАНЬ ТА ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКТИВНОСТІ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР**

Актуальними для сучасного рослинництва є впровадження біотехнологій в практику землекористування, скорочення або заміна хімічних засобів біопрепаратами, в тому числі, мікробними. На сьогоднішній день розроблено широкий спектр біопрепаратів на основі ґрунтових бактерій, які застосовують для підвищення продуктивності рослин та якості урожаю, захисту рослин від шкідливих організмів, зниження норм внесення мінеральних добрив та пестицидів. **Мета.** Дослідити вплив комплексного застосування мікробних препаратів Азотобактерин та Біофосфорин з фунгіцидами на розвиток хвороб томатів, огірка, капусти білоголової та їх продуктивність за культивування у відкритому ґрунті. **Методи.** Мікробіологічні методи виділення мікроміцетів з тканин інфікованих рослин; морфолого-фізіологічні методи ідентифікації фітопатогенних мікроміцетів родів *Alternaria*, *Pseudoperonospora* і *Fusarium*; методи польових досліджень; методи визначення розвитку хвороб та ефективності захисної дії біопрепаратів Азотобактерин (на основі *Azotobacter chroococcum* IMB B-7171), Біофосфорин (на основі *Bacillus megaterium* IMB B-7168) і фунгіцидів Акробат МЦ, Квадріс 250 SC, Ридоміл Голд МЦ 68 WG, Інфініто 61SC; статистичні методи. **Результати.** Біопрепарат Азотобактерин та його композиція з Біофосфорином у сумішах з такими фунгіцидами, як Акробат МЦ, Квадріс 250 SC, Інфініто 61 SC, Ридоміл Голд МЦ 68 WG зі зниженими нормами витрати забезпечували захисний ефект від фітопатогенів на рівні фунгіцидів з повними нормами витрати та підвищення врожайності овочевих культур на 11-39% порівняно з контролем. **Висновки.** Обробка препаратами азотфіксувальних і фосфатмобілізувальних бактерій сумісно з фунгіцидами зі зниженими нормами витрати сприяла контролю захворюваності томатів, огірка, капусти білоголової мікозами та підвищенню їх урожаю, що дає змогу зменшити пестицидне навантаження на агроценози в середньому на 17-33% і має важливе екологічне та економічне значення.

**Ключові слова:** мікробні препарати, фунгіциди, овочеві культури, захворюваність, продуктивність.





Високий урожай сільськогосподарських культур неможливо отримати без застосування засобів захисту рослин. З року в рік у період вегетації овочеві та інші сільськогосподарські культури уражуються хворобами, зокрема, мікозами. Томати найчастіше уражуються фітофторозом та альтернаріозом, огірки і цибуля – несправжньою борошнистою росою (псевдопероноспорозом), капуста – альтернаріозом, фузаріозним в'яненням, тощо. Ці хвороби спричиняють великі втрати, а іноді і загибель врожаю [6].

Для зниження втрат урожаю сільськогосподарських культур від ураження фітопатогенними мікроорганізмами використовують як хімічні, так і біологічні засоби захисту рослин, в тому числі, біопрепарати на основі мікроорганізмів. Інтерес до мікробних препаратів зумовлений ще й поступовою переорієнтацією агропромислового комплексу на екологічно спрямоване органічне землеробство для вирощування безпечної сільськогосподарської продукції. Проте застосування лише біологічних препаратів не завжди забезпечує довготривалий захисний ефект, а використання хімічних препаратів призводить до забруднення навколишнього середовища і небажаних санітарно-гігієнічних наслідків [2]. Тому актуальним є зниження пестицидного навантаження на агроценози шляхом розробки технологій комплексного застосування біологічних і хімічних препаратів (зі зменшеними нормами витрат) з метою отримання екологічно безпечної продукції овочівництва.

Біопрепарати в сумішах з пестицидами використовують на різних культурах і за різних способів обробки. За даними Чекалової зі співавторами [9], за вирощування овочевих культур у закритому ґрунті фунгіциди Фундазол, Фітофлавін-300, Квадріс не викликали негативного впливу на швидкість колонізації торфу клітинами мікроорганізмів *Trichoderma viride* та *Pseudomonas fluorescens* за їх внесення під рослини в одній баковій суміші. Це дозволяло уникати двоетапних обробок, що значно економило матеріальні та трудові витрати. Акулініним та Шевчуком випробувані бакові суміші мікробних засобів захисту рослин з хімічними пестицидами зі зменшеною в 10 разів концентрацією останніх [1]. Біопрепарати Бітоксисабацилін, Гаупсин та Лепідоцид застосовували в сумішах з інсектицидом Конфідор при захисті плодів культур від шкідників. Ефективність обробки біопрепаратами без додавання хімічного інсектициду була нижчою порівняно з сумішами. Комплексне застосування біологічних та хімічних засобів контролю патогенів дозволило регулювати біоценоз ризосфери на користь антагоністів фітопатогенів, обмежуючи розвиток корневих гнилей. Вільсон зі співавторами встановили ефективність протруювання бульб картоплі хімічним препаратом Флутоланилом разом з *Trichoderma harzianum* у боротьбі проти ризоктоніозу картоплі [14]. Сумісне використання *Bacillus subtilis* та *Ampelomyces quisqualis* з хімічними фунгіцидами Азоксистробін, Пенконазол, Міклобуталін, Квіносифен проти борошнистої роси цукіні дозволило суттєво обмежити розвиток хвороби та підвищити ефективність фунгіцидів, запобігаючи виникненню резистентності патогена до хімічних препаратів [11]. Авторами виявлено синергічний ефект застосування біологічних агентів разом з активними інгредієнтами фунгіцидів.

Відомий широкий спектр фунгіцидної дії біопрепаратів на основі азотфіксувальних мікроорганізмів, зокрема, *Azotobacter chroococcum* [2, 5, 15], та



бактерій роду *Bacillus* [2, 10–13]. Як показано нами раніше, такі препарати можуть застосовуватись у комплексі з фунгіцидами [4, 8]. Сумісне використання біологічних та хімічних препаратів можливе за різних способів: обробка насінневого матеріалу, внесення в ґрунт, обприскування рослин різних сільськогосподарських культур під час вегетації.

Метою даної роботи було дослідити вплив комплексного застосування мікробних препаратів Азотобактерин та Біофосфорин з фунгіцидами на розвиток хвороб і продуктивність томатів, огірка, капусти білоголової за їх культивування у відкритому ґрунті.

### Матеріали і методи

Досліди проводили в польових умовах у господарствах Київської області. Томати і капусту білоголову сорту Яна вирощували на полях Київської дослідної станції (Фастівський район, смт Борова), огірки і капусту білоголову сорту Нісса – на полях Сквирської дослідної станції. Повторність дослідів 4-разова. Для захисту овочевих культур від хвороб використовували біологічні препарати на основі бактерій родів *Azotobacter* та *Bacillus*: Азотобактерин (на основі *Azotobacter chroococcum* ІМВ В-7171, титр  $10^8$  кл./мл, норма витрати 0,5–1,0 л/га) та Азотобактерин у комплексі з Біофосфорином (на основі *Bacillus megaterium* ІМВ В-7168, титр  $10^9$  кл./мл, норма витрати 1,0 л/га) у співвідношенні 1:1. Штами селекціоновані у відділі загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України. Для контролю мікозів овочевих культур сумісно з біопрепаратами застосовували відомі комерційні фунгіциди Акробат МЦ, в.г. (диметоморф, 90 г/кг + манкоцеб, 600 г/кг), Квадріс 250 SC, к.с. (азоксистробін, 250 г/л), Ридоміл Голд МЦ 68 WG, в.г. (металаксил-М, 40 г/кг+манкоцеб, 640 г/кг), Інфініто 61SC, к.с. (флуопіколід, 62,5 г/л+пропамокарб гідрохлорид, 625 г/л), які брали зі зменшеними нормами витрати, а саме: Ридоміл Голд МЦ 68 WG – на 20%; Акробат МЦ та Інфініто 61SC – на 25%; Квадріс 250 SC – на 17% за вирощування томатів та капусти і на 33% за вирощування огірка.

У період вегетації обприскування рослин овочевих культур згідно схем дослідів проводили тричі за вегетаційний період: профілактично до появи перших ознак хвороби, з появою перших ознак ураження та через 8–12 діб після попередньої обробки. За еталон брали фунгіцид з повною нормою витрати. Перед кожною обробкою проводили обліки ураження рослин хворобами. Робочі розчини препаратів готували з розрахунку 300–500 л/га, виходячи з норм їх витрати. Визначали розвиток хвороб, ефективність дії препаратів проти хвороб, урожайність культур за відомими формулами [3].

Статистичне опрацювання результатів експериментів, а саме дисперсійний аналіз даних і розрахунок величини найменшої істотної різниці (НІР<sub>0,05</sub>) виконували, використовуючи стандартні комп'ютерні програми Statgraphics та Excel 2013.

### Результати досліджень та їх обговорення

Згідно отриманих результатів досліджень, мікробні препарати за самостійного застосування та в сумішах з фунгіцидами ефективно контролювали





розвиток хвороб овочевих культур.

На помідорах у роки досліджень внаслідок сухої спекотної погоди серед хвороб домінувала суха плямистість (альтернаріоз), збудниками якої були *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. і *Alternaria solani* Sorauer (табл. 1).

Таблиця 1

**Ефективність сумісного застосування біопрепаратів з фунгіцидами проти альтернаріозу помідорів**

Table 1

**Efficiency of joint use of bioformulations with fungicides against alternarioz of tomatoes**

Варіант досліджу		Ефективність дії, %			Урожай плодів	
		I*	II	III	т/га	% до контролю
Сорт Атласний	Контроль (без обробки)	-	-	-	29,0	-
	Азотобактерин, 0,5 л/га	71,4	33,8	9,9	33,0	113,8
	Азотобактерин, 0,5 л/га + Ридоміл Голд МЦ, 2,0кг/га	79,4	40,4	26,7	37,1	127,9
	Ридоміл Голд МЦ, 2,0кг/га	73,0	33,4	13,5	33,2	114,6
	Ридоміл Голд МЦ, 2,5кг/га	87,3	37,6	25,3	34,3	118,1
	НІР <sub>0,05</sub>	-	-	-	1,9	-
Сорт Кібіц	Контроль (без обробки)	-	-	-	26,8	-
	Азотобактерин, 0,5л/га	70,8	53,3	21,1	31,1	116,0
	Азотобактерин, 0,5 л/га + Квадріс 250SC, 0,5 л/га	70,8	69,3	28,7	30,7	114,6
	Квадріс 250 SC, 0,6 л/га	79,2	72,7	27,7	29,6	110,4
	НІР <sub>0,05</sub>	-	-	-	4,8	-
Сорт Флора	Контроль (без обробки)	-	-	-	46,7	-
	Азотобактерин+Біофосфорин, 1,0 л/га	86,1	70,1	39,9	49,8	106,6
	Азотобактерин+Біофосфорин, 1,0 л/га + Акробат МЦ, 1,5 кг/га	86,9	82,2	49,8	53,8	115,2
	Акробат МЦ, 2,0 кг/га	89,7	80,2	50,4	53,8	115,2
	НІР <sub>0,05</sub>	-	-	-	2,2	-

\* I, II, III – обліки в період вегетації

\* I, II, III – accountings during the growing season

Перші ознаки хвороби відмічали в першій декаді липня, а максимального розвитку хвороба досягала на початку серпня. Розвиток хвороби на контрольних ділянках (без застосування препаратів) у період вегетації помідорів становив на сорті Атласний – 6,3–47,5%, на сорті Кібіц – 2,4–48,4%, на сорті Флора – 7,2–31,3%.

Ефективність досліджуваних біопрепаратів вивчали за їх сумісного ви-



користання з різними фунгіцидами. Найвищу ефективність препаратів в усіх дослідах було отримано за профілактичного застосування. Перші обліки засвідчили, що ефективність профілактичного обприскування на досліджуваних сортах становила 70,8–86,9%. В подальшому за зростання ступеня розвитку хвороби ефективність біопрепаратів знижувалась.

Сумісне застосування біопрепаратів з фунгіцидами, які брали зі зменшеною нормою витрати, забезпечило значно вищий захисний ефект порівняно з самостійним застосуванням біопрепаратів. Ефективність таких сумішей була на рівні фунгіциду з повною нормою витрати, або дещо вищою. Найбільшу ефективність препаратів отримано на сорті Флора. Бакова суміш Азотобактерин+Біосфорин+Акробат МЦ (1,5 кг/га, що на 25% менше за повну норму) забезпечила ефективність дії в середньому за період спостережень на рівні 73,0%. Для порівняння, ефективність фунгіциду Акробат МЦ з повною нормою витрати (2,0 кг/га) на цьому сорті становила в середньому 73,4% (табл. 1).

Використання біопрепаратів сприяло підвищенню врожайності томатів. На всіх сортах урожай у дослідних варіантах переважав такий у контролі. Найвищий приріст урожаю отримано за використання сумішей Азотобактерин+Ридоміл Голд МЦ (зі зменшеною на 20% нормою витрати) на сорті Атласний та Азотобактерин+Біосфорин +Акробат МЦ (зі зменшеною на 25% нормою витрати) на сорті Флора – відповідно на 27,9% та 15,2%. На сорті Кібіц урожайність томатів у варіантах з біопрепаратом була фактично на одному рівні, перевищуючи таку у контролі на 14–16% (табл. 1). При цьому різниця між варіантами знаходилась у межах похибки експерименту.

На огірку ефективність дії біопрепарату Азотобактерин проти несправжньої борошнистої роси (псевдопероноспорозу) досліджували за його використання самостійно та сумісно з фунгіцидом Квадріс 250 SC з нормою витрати 0,4 л/га (зменшеною на 33%). Розвиток хвороби, збудником якої були фітопатогенні гриби *Pseudoperonospora cubensis* [(Berkeley and M.A.Curtis) Rostovzev], на контрольних ділянках без застосування препаратів у період вегетації рослин становив 12,1–74,5%.

Найвищий захисний ефект одержано за сумісного застосування Азотобактерину та Квадріс 250 SC (табл. 2). Ефективність цієї композиції протягом періоду вегетації становила в середньому 60,7% і була достовірно на 3,0% вищою за ефективність окремо взятого фунгіциду Квадріс 250 SC з нормою витрати 0,6 л/га і на 11,6% вищою за ефективність Азотобактерину. Комплексне використання біопрепарату з фунгіцидом забезпечило одержання найвищого врожаю плодів огірка: приріст урожаю становив 6,9 т/га, що на 38,5% більше порівняно з контролем.

Проти хвороб капусти білоголової досліджували ефективність біологічного препарату Азотобактерин сумісно з фунгіцидами Інфініто 61 SC (зі зменшеною на 25% нормою витрати) та Квадріс 250 SC (зі зменшеною на 17% нормою витрати) (табл. 3).

На ранньостиглому сорті капусти Нісса домінувало фузаріозне в'янення, викликане *Fusarium oxysporum* Schlecht., а на пізньостиглому сорті Яна – альтернаріоз, збудником якого були фітопатогенні гриби *Alternaria brassicae* Sacc.



Таблиця 2

Ефективність сумісного застосування Азотобактерину з фунгіцидом Квадріс 250 SC проти псевдопероноспорозу огірка (гібрид Левадний F<sub>1</sub>)

Table 2

Efficiency of joint use of Azotobacterin with fungicide Quadris 250 SC against pseudoperonosporoz of cucumber (hibrid Levadny F<sub>1</sub>)

Варіант досліджу	Ефективність дії, %			Урожай	
	I*	II	III	т/га	% до контролю
Контроль (без обробки)	-	-	-	17,9	-
Азотобактерин, 0,5 л/га	77,7	59,8	9,7	23,5	131,4
Азотобактерин + Квадріс 250SC, 0,4 л/га	91,7	71,6	18,7	24,8	138,5
Квадріс 250SC, 0,6 л/га	89,3	64,2	19,5	24,4	136,3
НІР <sub>0,05</sub>	-	-	-	1,3	-

\* I, II, III – обліки в період вегетації

\* I, II, III – accountings during the growing season

Таблиця 3

Ефективність сумісного застосування Азотобактерину з фунгіцидами проти хвороб капусти білоголової

Table 3

Efficiency of joint use of Azotobacterin with fungicides against diseases of white cabbage

Варіант досліджу		Ефективність дії, %			Урожай	
		I*	II	III	т/га	% до контролю
Сорт Нісса, фузаріозне в'янення	Контроль (без обробки)	-	-	-	11,1	-
	Азотобактерин, 0,5 л/га	57,1	45,2	31,9	12,4	111,5
	Азотобактерин + Інфініто 61 SC, 1,2 л/га	57,1	53,7	47,8	12,3	110,9
	Інфініто 61 SC, 1,6 л/га	71,4	60,1	53,4	12,0	108,3
	НІР <sub>0,05</sub>	-	-	-	5,4	-
Сорт Яна, альтернаріоз	Контроль (без обробки)	-	-	-	40,0	-
	Азотобактерин, 1,0 л/га	58,1	47,5	34,0	45,5	113,7
	Азотобактерин + Квадріс 250 SC, 0,5 л/га	59,7	74,3	53,5	45,8	114,5
	Квадріс 250 SC, 0,6 л/га	62,9	76,2	49,5	45,6	114,0
	НІР <sub>0,05</sub>	-	-	-	2,2	-

\* I, II, III – обліки в період вегетації

\* I, II, III – accountings during the growing season



За розвитку фузаріозного в'янення на контрольних ділянках у період вегетації рослин на рівні 10,5–23,2% ефективність композиції Азотобактерин+Інфініто 61 SC становила 47,8–57,1%. При цьому в дослідних варіантах було зібрано 12,0–12,4 т/га капусти, що на 8,3–11,5% більше, ніж у контрольному варіанті.

Проти альтернаріозу капусти на сорті Яна найвищу ефективність одержано за сумісного використання Азотобактерину та фунгіциду Квадріс 250 SC. За розвитку альтернаріозу в контролі на рівні 12,4–40,0% ефективність комплексного захисту становила в середньому 62,5%, а ефективність фунгіциду Квадріс 250 SC з повною нормою витрати (0,6 л/га) – 62,9% (табл. 3).

Приріст урожаю капусти у варіанті з сумісним застосуванням мікробного препарату з хімічним становив 5,8 т/га, що на 14,5% більше, ніж в контрольному варіанті.

За сумісного застосування біопрепаратів з фунгіцидами у більшості варіантів спостерігали посилений стимулювальний ефект за досліджуваними показниками. Це може свідчити про комплексну дію мікробних препаратів і діючих речовин хімічних фунгіцидів на фітопатогени і рослини. Адже біоагенти мікробних препаратів, активно заселяючи фітосферу і конкуруючи з патогенами за елементи живлення, можуть викликати пробіотичний ефект. Крім того, вони можуть чинити безпосередній біоцидний вплив на фітопатогени, виділяючи в оточуюче середовище специфічні екзосметаболіти (антибіотичні речовини, літичні ферменти, тощо). А завдяки синтезу поживних та рістстимулювальних сполук, необхідних для розвитку рослин, агрономічно корисні бактерії сприяють виникненню системної індукованої стійкості, підвищенню імунного статусу і продуктивності культурних рослин.

Таким чином, обробка препаратами азотфіксувальних і фосфатмобілізувальних бактерій сумісно з фунгіцидами зі зниженими нормами витрати сприяла контролю захворюваності томатів, огірка, капусти білоголової мікозами та підвищенню їх урожаю. Це дає змогу зменшити пестицидне навантаження на агроценози в середньому на 17–33%, що має важливе екологічне та економічне значення.



L. V. Tytova<sup>1</sup>, V. G. Sergienko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine,  
154, Zabolotny str., Kyiv, 03143, tel:+38 (044) 526 34 87,  
e-mail: ltytova.07@gmail.com

<sup>2</sup> Institute of Plant Protection of NAAS of Ukraine, 33, Vasylykivska str., Kyiv, 03022,  
tel.: +38 (044) 257 11 24, e-mail: vg\_sergienko@bigmir.net

## THE EFFICIENCY OF THE COMPLEX USE OF MICROBIAL FORMULATIONS AND FUNGICIDES FOR THE DISEASES CONTROL AND PRODUCTIVITY INCREASE OF VEGETABLE CROPS

### Summary

*The introduction of biotechnologies into the practice of land use, the reduction or replacement of chemicals by bioformulations, including microbial, are relevant for modern crop production. To date, a wide range of biological products based on soil bacteria has been developed, they are used to increase plant productivity and crop quality, protect plants from harmful organisms, and reduce the rate of mineral fertilizers and pesticides application. **Aim.** To study the effect of the complex use of microbial preparations Azotobacterin and Biophosphorin together with fungicides on the tomatoes, cucumbers, white cabbage diseases development and their productivity under field cultivation. **Methods.** Microbiological methods of micromycetes isolation from infected plants tissues; morphological and physiological methods of identification of phytopathogenic micromycetes of Alternaria, Pseudoperonospora and Fusarium genus; methods of field studies; methods of determination of diseases development and the effectiveness of protective action of biopreparations Azotobacterin (based on Azotobacter chroococcum IMB B-7171), Biophosphorin (based on Bacillus megaterium IMB B-7168) and fungicides Acrobat MC, Quadris 250 SC, Infinito 61 SC, Ridomil Gold MC 68 WG; statistical methods. **Results.** The bioformulation Azotobacterin and its composition with Biophosphorin in the mixtures with such fungicides as Acrobat MC, Quadris 250 SC, Infinito 61 SC, Ridomil Gold MC 68 WG with reduced consumption rates have provided a protective effect against pathogens at the level of fungicides with full consumption rates and the increase in yield of vegetable crops by 11–39% compared to control. **Conclusions.** Application of nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing bacteria together with fungicides with the reduced consumption rates contributed to decrease of the tomatoes, cucumbers, white cabbage diseases control and increase in their yield, which makes possible to reduce the pesticide load on agrocenosis by an average of 17-33% and has significant environmental and economic importance.*

**Key words:** microbial formulations, fungicides, vegetable crops, morbidity, productivity.



Л. В. Титова<sup>1</sup>, В. Г. Сергиенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, тел.: +38(044) 526 34 87, e-mail: ltytova.07@gmail.com

<sup>2</sup> Институт защиты растений НААН Украины, ул. Васильковская, 33, Киев, 03022, тел.: +38(044) 257 11 24, e-mail: vg\_sergienko@bigmir.net

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ФУНГИЦИДАМИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР

### Реферат

Актуальными для современного растениеводства являются внедрение биотехнологий в практику земледелия, сокращение или замена химических средств биопрепаратами, в том числе, микробными. На сегодняшний день разработан широкий спектр биопрепаратов на основе почвенных бактерий, которые применяют для повышения продуктивности растений и качества урожая, защиты растений от вредных организмов, снижения норм внесения минеральных удобрений и пестицидов. **Цель.** Изучить влияние комплексного применения микробных препаратов Азотобактерин и Биофосфорин с фунгицидами на развитие болезней томатов, огурца, капусты белокочанной и их продуктивность при культивировании в открытом грунте. **Методы.** Микробиологические методы выделения микромицетов из тканей инфицированных растений; морфолого-физиологические методы идентификации фитопатогенных микромицетов родов *Alternaria*, *Pseudoperonospora* и *Fusarium*; методы полевых исследований; методы определения развития болезней и эффективности защитного действия биопрепаратов Азотобактерин (на основе *Azotobacter chroococcum* ИМВ В-7171), Биофосфорин (на основе *Bacillus megaterium* ИМВ В-7168) и фунгицидов Акробат МЦ, Квадрис 250 SC, Ридомил Голд МЦ 68 WG, Инфинито 61SC; статистические методы. **Результаты.** Биопрепарат Азотобактерин и его композиция с Биофосфорин в смесях с такими фунгицидами, как Акробат МЦ, Квадрис 250 SC, Инфинито 61 SC, Ридомил Голд МЦ 68 WG, со сниженными нормами расхода обеспечивали защитный эффект от фитопатогенов на уровне фунгицидов с полными нормами расхода и повышение урожайности овощных культур на 11–39% по сравнению с контролем. **Выводы.** Обработка препаратами азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих бактерий совместно с фунгицидами со сниженными нормами расхода способствовала контролю заболеваемости томатов, огурца, капусты белокочанной микозами и повышению их урожая, что дает возможность уменьшить пестицидную нагрузку на агроценозы в среднем на 17–33% и имеет важное экологическое и экономическое значение.

**Ключевые слова:** микробные препараты, фунгициды, овощные культуры, заболеваемость, продуктивность.





## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Акулинин Г. И., Шевчук И. В. Опыт совместного применения химических пестицидов с микробиологическими // Міжнародна науково-практична конференція «Інтегрований захист рослин на початку ХХІ століття» (Київ, листопад, 2004 р.): тез. доп.– К.: Світ, 2004. – С. 371–374.
2. Коломієць Ю. В., Таргоня В. С., Григорюк І. П. Системний підхід до розроблення комплексних заходів захисту рослин томатів на основі використання біотехнологічних альтернатив // Агробіологія. – 2016. – № 2. – С. 27–33.
3. Методики випробування і застосування пестицидів / За ред. С. О. Трибеля. – К.: Світ, 2001. – 448 с.
4. Миколаєвський В., Сергієнко В., Титова Л. Влияние предпосевной бактериализации семян на развитие болезней и урожайность сои // Stiinta Agricola. – 2017. – № 1. – С. 55–59.
5. Минаева О. М., Акимова Е. Е., Евдокимов Е. В. Кинетические аспекты ингибирования роста грибов ризосферными бактериями // Прикл. биохим. и микробиол. – 2008. – Т. 44, № 5. – С. 565–570.
6. Переверзева В. Ф. Биологическая защита овощных культур от наиболее вредоносных болезней // Овочівництво і баштанництво. – 2001. – в. 45. – С. 297–301.
7. Сергієнко В. Г., Ткаленко А. Н., Титова Л. В. Использование биопрепаратов для защиты овощных культур от болезней // Защита и карантин растений. – 2010. – №7. – С.28-30.
8. Титова Л. В., Сергієнко В. Г., Антипчук А. Ф. Препарати азотфіксуючих бактерій. Вплив на хворобостійкість і продуктивність томатів // Карантин і захист рослин. – 2005. – № 10. – С.24–27.
9. Чекалова К. В., Марквичев Н. С., Подшивалова Е. И. и др. Совмещение биопрепаратов с химическими средствами // Картофель и овощи. – 2006. – № 8. – С. 20.
10. Compant S. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – 71. – P.4951-4959.
11. Gilardi G., Manker D. Efficacy of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* and *Ampelomyces quisqualis* applied in combination with fungicides against powdery mildew of zucchini // J. Plant Diseases and Prot. – 2008. – 115, №5. – P. 208–213.
12. Moshafi M., Forootanfar H., Ameri A., Shacibale M., Dehghan-noudeh G., Razavi M. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. strain FAS1 isolated from soil // Pac. J. Pharm. Sci. – 2011. – 24, № 3. – P. 269–275.
13. Perez-Garcia A., Romero D., de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture// Current Opinion in Biotechnology. – 2011. – 22. – P. 187–193
14. Wilson P. S., Ahvenniemi P. M., Lehtonen M. J. Biological and chemical control and their combined use to control different stages of the Rhizoctonia disease complex on potato through the growing season // Ann. Appl. Biol. – 2008. – 153, № 3. – P. 307–320.



15. А.с. 1703634 А1 СССР, МВІ С 05 F 11/08. С 12 N 1/20. Штамм бактерий *Azotobacter chroococcum* для получения препарата, применяемого в растениеводстве. Чекакина Е. В, Новогрудская Е. Д., Булгакова Г. М., Корчак Т. С. (СССР). – заявл. 08.12.1988; опубл. 07.01.1992, Бюл. № 1.

### References

1. Akulinin GI, Shevchuk IV. Experience of combined use of chemical pesticides with microbiological. In: Proceedings of the international science-practical conference «Integrated plant protection at the beginning of the XXI century».– Kyiv: Svit, 2004: 371–374.
2. Kolomiets YuV, Tarhonya VS, Hryhoryuk IP. System approach to development of complex protection measures for tomato plants on the basis of the use of biotechnological alternatives. *Ahrobiolohiya*. 2016; 2: 27–33.
3. Methods of testing and application of pesticides Ed Trybel SO. Kyiv: Svit, 2001. 448 p.
4. Mikolaevskij V, Sergienko V, Tytova L. Influence of pre-sowing bacterization of seeds for the development of diseases and soybean cultivation. *Stiinta Agricola*. 2017; 1: 55–59.
5. Minaeva OM, Akimova EE, Evdokimov EV. Kinetic aspects of inhibition of growth of fungi by rhizospheric bacteria. *Prikl. biohim. i mikrobiol.* 2008; 44(5): 565–570.
6. Pereverzeva VF. Biological protection of vegetable crops from most harmful diseases. *Ovochivnictvo i bashtannictvo*. 2001; 45: 297–301.
7. Sergienko VG, Tkalenko AN, Tytova LV. Usage of biopreparations to vegetable crops protection from diseases. *Zashchita i karantin rastenij*. 2010; 7: 28–30.
8. Tytova LV, Serhiyenko VH, Antypchuk AF. Nitrogen-fixing bacteria preparation. Influence on disease resistance and productivity of tomatoes. *Karantyn i zaxyst roslyn*. 2005; 10: 24–27.
9. Chekalova KV, Markvichev NS, Podshivalova EI. Combination of biopreparations with chemical agents. *Kartofel' i ovoshchi*. 2006; 8: 20.
10. Compant S. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71: 4951–4959.
11. Gilardi G, Manker D. Efficacy of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* and *Ampelomyces quisqualis* applied in combination with fungicides against powdery mildew of zucchini. *J. Plant Diseases and Prot.* 2008; 115(5): 208–213.
12. Moshafi M, Forootanfar H, Ameri A, Shacibale M, Dehghan-noudeh G, Razavi M. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. strain FAS1 isolated from soil. *Pac. J. Pharm. Sci.* 2011; 24(3): 269–275.
13. Perez-Garcia A, Romero D, de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011; 22: 187–193.
14. Wilson PS, Ahvenniemi PM, Lehtonen MJ. Biological and chemical control and their combined use to control different stages of the *Rhizoctonia*



disease complex on potato through the growing season. Ann. Appl. Biol. 2008; 153(3): 307–320.

15. A.s. 1703634 A1 SSSR, MBI C 05 F 11/08. C 12 N 1/20. Strain of bacteria *Azotobacter chroococcum* to produce a preparation used in crop production. Chekasina EV, Novogrudskaya ED, Bulgakova GM, Korchak TS. (SSSR). – zayavl. 08.12.1988; opubl. 07.01.1992, Byul. №1.

Стаття надійшла до редакції 23.10.2018 р.



**М. А. Лопухова<sup>1</sup>, О. Б. Паузер<sup>1</sup>, І. П. Якуба<sup>1</sup>, М. М. Артюх<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна, e-mail: marilopuhova@gmail.com

<sup>2</sup> Національний науковий центр “Інститут виноградарства та виноробства  
ім. В. С. Таїрова”, вул. 40-річчя Перемоги, 27, ПМТ Таїрове, Одеса,  
Овідіопольський р-н, Одеська обл., 65496, Україна

## **ЯКІСТЬ СОКУ ТА ВИНА З ВИНОГРАДУ АРОМАТНИЙ ТА КАБЕРНЕ СОВІНЬЙОН ЗА ОБРОБКИ ЛОЗИ БІОПРЕПАРАТОМ АГРОМАР**

**Мета.** Метою роботи було з'ясувати вплив обробки рослин винограду біопрепаратом “АгроМар” на соку виноматеріалів та вина сортів Ароматний та Каберне Совіньйон. **Методи.** Препарат “АгроМар” – біофунгіцид на основі *Trichoderma lignorum*, що володіє потрійним біологічним спектром дії: біозахист, біостимуляція і біодобриво. Дослідження проводили в 2016–2017 рр. у виноградниках та лабораторії фізіології відділу розмноження ННЦ «ІВіВ ім. В. С. Таїрова». Польові досліді проводили на технічних сортах Ароматний та Каберне Совіньйон. В період вегетації дослідні кущі обприскували розчином АгроМар в концентрації 0,3 л / 10 л води (дрібнодисперсне обприскування), чотири рази. Збір урожаю проводили в першу декаду вересня. Цукристість соку винограду визначали методом Бертрана. Кислотність титриметричним методом. Вино виготовлено на базі винзаводу Інституту ім. В. С. Таїрова. Вміст металів визначали методом атомноабсорбційної спектrophотометрії. **Результати.** Показано, що обробка АгроМаром підвищує якість соку, а саме підвищення цукристості та зниження кислотності протягом 2-х років у обох сортів, як у білому з винограду Ароматний, так і червоному з Каберне Совіньйон. Обробка АгроМаром покращує органолептичні показники якості вина – колір, смак та аромат, які підвищують дегустаційну оцінку білого вина на 0,1 бала, червоного – на 0,6 та 1,0 бали у 2016 та 2017 рр., відповідно. Обробка біопрепаратом підвищує вміст заліза та марганцю у білому вині з винограду Ароматний та червоному вині з винограду Каберне Совіньйон, а також знижує до двох разів вміст важких металів цинку та міді. **Висновки.** можна стверджувати, що біопрепарат АгроМар позитивно впливає на якість соку та вина, а також покращує мікроелементний склад вина.

**Ключові слова:** Каберне Совіньйон, Ароматний, біофунгіцид АгроМар, залізо, мікроелементи.

Однією з основних сучасних тенденцій розвитку рослинництва є збільшення об'ємів виробництва продукції органічного землеробства. Для захисту рослин винограду від фітопатогенів та зниження токсичного навантаження в агроценозах стали широко використовувати біопрепарати нового покоління, які мають широкий спектр дії. Перевагою цих препаратів є те, що вони абсо-

© М. А. Лопухова, О. Б. Паузер, І. П. Якуба, М. М. Артюх, 2018



лютно безпечні для людей та навколишнього середовища [6].

Препарат “АгроМар” – біофугіцид на основі *Trichoderma lignorum*, що володіє потрійним біологічним спектром дії: біозахист, біостимуляція і біодобриво [1]. *Trichoderma* – рід сапротрофних грибів мікроміцетів з родини *Hypocreaceae*. Препарат тріходерми пригнічує розвиток фітопатогенів наступними шляхами: – прямим паразитуванням, – конкуренцією за субстрат, – виділенням ферментів, – виділенням антибіотиків (гліотоксин, вірідін, триходермін та ін.) – виділенням інших біологічно активних речовин, котрі пригнічують розвиток багатьох видів збудників та гальмують їх репродуктивну здатність. В ґрунті гриб розвивається на різних рослинних залишках, багатих целюлозою, на міцелії, плодових тілах фітопатогенів [1].

Препарат збільшує контроль над захворюваннями деяких сільгоспкультур, сприяє активізації ростових процесів у виноградних рослинах. Біопрепарати на основі тріходерми часто і з успіхом використовуються у рослинництві, зокрема виноградарстві, але саме новий для ринку України препарат “АгроМар” було вперше використано з метою покращення агробіологічних показників виноградних рослин.

Метою даної роботи було з'ясувати вплив обробки рослин винограду біопрепаратом АгроМар на якість соку та вина сортів Ароматний та Каберне Совіньон.

### Матеріали та методи

Дію нового біопрепарату АгроМар та його вплив на якість виноградного соку сортів Ароматний та Каберне Совіньон вивчали в період вегетації винограду. Дослідження проводили в 2016–2017 рр. в лабораторії фізіології відділу розмноження ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова». Всі польові досліди проводили на технічних сортах Ароматний та Каберне Совіньон. Формування кущів – горизонтальний двуплечий кордон з одним–двома штаблами висотою 80 см. Схема посадки 3 на 1,5 м. Культура винограду – не укритва без поливу. Агротехнічні заходи загальноприйняті в даній зоні виноградарства. Розміщення варіантів рандомізоване, повторностей – систематичне, повторність триразова. Кущі відбиралися рівні за силою росту і елементам плодоношення. В період вегетації дослідні кущі обприскували розчином препарату АгроМар в концентрації 0,3 л / 10 л води (дрібнодисперсне обприскування ручним обприскувачем). Обприскування проводили за 7–10 днів до цвітіння (I термін), відразу після цвітіння (II термін), на початку дозрівання ягід (III термін) і після дозрівання ягід (IV термін). Контроль (обприскування водою) здійснювали відповідно до кожного строку обробки. Дослід здійснювали в 3-х повторностях, по 10 кущів у повторності.

Збір урожаю проводили в першу декаду вересня. Цукристість соку винограду визначали методом Бертрана, кислотність титриметричним методом [5]. Вино виготовлено на базі винзаводу Інституту ім. В. Є. Таїрова. Органолептичну оцінку якості вина здійснювала дегустаційна комісія ННЦ ім. В. Є. Таїрова за показниками: колір, аромат, смак, оцінку розраховували за 10-бальною шкалою.

Вміст металів визначали методом атомноабсорбційної спектроскопії



метрії. на спектрофотометрах фірми VARIAN Spectr AA-220 (полум'яний варіант) та Spectr AA-800 (варіант атомізації у графітовій печі). Рослинний матеріал (наважкою 0,3–0,5 г) розкладали з використанням азотної кислоти. Розраховували вміст марганцю у міліграмах на 1 кілограм абсолютно сухої речовини [9].

Статистичне опрацювання результатів виконували за допомогою ПЗ MS OpenOffice Excel, порівняння варіантів здійснювали з використанням критерію Стьюдента [4].

### Результати та їх обговорення

Застосування АгроМару, за даними, наведеними у попередніх працях [7] спричиняє позитивний вплив на фізіологічні та агробіологічні показники рослин винограду. Отриманий з оброблених рослин врожай винограду було перероблено у вино. Результати дослідження свідчать про те, що кондиції соку ягід значно покращуються, що дуже важливо для технічних сортів. Слід відмітити, що у 2016–2017 роках цукристість соку була висока завдяки сухим та спекотним умовам літа, але у дослідних варіантах є тенденція до її підвищення відносно контролю. Кислотність соку в дослідних варіантах коливалася в межах контролю, чи нижче за контроль (табл. 1).

Таблиця 1

Якісні показники соку винограду сортів Ароматний та Каберне Совіньйон

Table 1

Quality indicators of grape juice of grape varieties Aromatny and Cabernet Sauvignon

Сорт	Варіант	2016 рік		2017 рік	
		Цукристість соку, г/100см <sup>3</sup>	Кислотність соку, г/дм <sup>3</sup>	Цукристість соку, г/100см <sup>3</sup>	Кислотність соку, г/дм <sup>3</sup>
Ароматний	Контроль	20,3±1,5	5,7±0,2	21,0±1,0	5,8±0,2
	АгроМар	21,4±1,1	5,2±0,1*	22,3±0,9	6,0±0,1
Каберне Совіньйон	Контроль	17,8±0,7	8,6±0,6	20,2±1,1	7,6±0,1
	АгроМар	18,4±0,8	8,3±0,4	21,8±0,8	7,3±0,1

Примітка: \* – різниця з контролем з вірогідністю вище 95%.

Note: \* – the difference with the control has probability above 95%.

Дегустації вина сортів Ароматний та Каберне Совіньйон, зроблених з винограду дослідних ділянок, оброблених біопрепаратом АгроМар, показали вищу якість цих зразків по відношенню до контролів. Відмічено, що вони мають інтенсивніший аромат, смак, екстрактивність (табл. 2).

Мікроелементний склад вина залежить від двох факторів — умов вирощування винограду (які є сумою ґрунтово-кліматичних умов та агротехніки) та методу, що використовується для виготовлення вина. З одного боку, він відображає фізіологічний стан рослин винограду, з іншого мікроелементи вина важливі як компонент раціону людини.

Мідь безперечно є важливим елементом живлення для росту і розвитку рослин [2], так як входить до складу ферментів (поліфенолоксидази, аскор-





біноксидази, альдолази), сприяє відновленню та фіксації азоту (входить до складу нітратредуктазного комплексу), бере участь у фотосинтезі, диханні, перерозподілі вуглеводів, впливає на проникність судин ксилеми для води і, таким чином, підтримує баланс вологи [3].

Таблиця 2

Органолептичні показники якості вина з винограду сортів Ароматний та Каберне Совіньйон за обробки препаратом АгроМар

Table 2

Organoleptic indicators of wine quality from grape varieties Aromatny and Cabernet Sauvignon after treatment of vines with AgroMar

Сорт	Варіант	2016 рік		2017 рік	
		Контроль	АгроМар	Контроль	АгроМар
Ароматний	Колір	світло-солом'яний, окислений	світло-солом'яний	солом'яний	солом'яний
	Аромат	слабко виражений	сортний, ананасовий	консервованій ананас	ананасовий, персик, жовтий абрикос, нектарин, соковите яблуко
	Смак	сортний	гармонійний	простий, гармонійний	фруктовий
	Оцінка	7,75	7,85	8,2	8,8
Каберне Совіньйон	Колір	нетиповий, слабкий	типний, виражений	рубіновий, чистий	рубіновий
	Аромат	типний	смородина, ув'ялена вишня	ягідний	малиновий
	Смак	типний, слабковиражений	сортний, сухофрукти	пасльонові тони	пасльонові тони, стигла вишня, ожина, чорниця, шоколад
	Оцінка	7,79	7,86	7,6	8,6

Цинк входить до складу приблизно 40 ферментів, а також неспецифічно активує або пригнічує близько 50 ферментів. Ферменти, що містять цинк беруть участь в фосфорному, вуглеводному, білковому обміні рослин, у фотосинтезі, окисно-відновних реакціях [3].

Як і Zn, Mn має антиоксидантний ефект на рослинні тканини. Він може слугувати антиоксидантом шляхом окиснення  $Mn^{2+}$  до  $Mn^{3+}$  і є також структурним компонентом антиоксидантних ферментів (наприклад, супероксиддисмутази та каталази), а також комплексу фотолізу води у фотосинтезі [11].

Йони заліза посідають особливу роль у фізіології рослин винограду, як компоненти великої кількості білків, які беруть участь у здійсненні окисно-відновних реакцій. Крім чисто фізіологічних функцій, мідь та залізо відіграють важливу роль у самому процесі виноробства, сприяючи стабілізації вина [10].

Дослідження вмісту мікроелементів у вині показало, що червоне вино



за винограду сорту Каберне Совіньйон має більшу кількість заліза, марганцю, цинку та міді, ніж біле за винограду сорту Ароматний (табл. 3).

Таблиця 3

**Вміст заліза та мікроелементів у вині з винограду сортів Ароматний та Каберне Совіньйон, мг/кг**

Table 3

**The content of iron and trace elements in wine from grape varieties Aromatny and Cabernet Sauvignon, mg / kg**

Рік	Сорт	Варіант	Fe	Mn	Zn	Cu
2016	Ароматний	Контроль	0,85±0,04	0,80±0,05	0,19±0,03	0,28±0,05
		АгроМар	0,98±0,03*	0,90±0,03*	0,16±0,02	0,24±0,02
	Каберне Совіньйон	Контроль	1,03±0,07	0,88±0,07	0,25±0,06	0,31±0,01
		АгроМар	1,25±0,04*	1,16±0,03*	0,13±0,02*	0,20±0,03*
2017	Ароматний	Контроль	0,80±0,01	0,87±0,03	0,18±0,03	0,35±0,04
		АгроМар	1,11±0,02	0,92±0,03	0,09±0,02*	0,18±0,01*
	Каберне Совіньйон	Контроль	1,02±0,06	1,09±0,07	0,25±0,03	0,39±0,07
		АгроМар	1,40±0,07*	1,24±0,02*	0,18±0,04*	0,20±0,05*

Надходженню мікроелементів у виноград за вирощування на карбонатному чорноземі заважає їх низька доступність [3]. Особливо рослини потерпають від залізного хлорозу. Тому покращення загального стану виноградних рослин може сприяти їх кращому мікроелементному живленню. Протягом обидвох років досліджень спостерігали, що за впливу препарату АгроМар в дослідних варіантах підвищується вміст заліза у білому та червоному вині на 15% та 21% у 2016 році та на 38% та 37% у 2017 році, відповідно. Зростає також вміст марганцю у вині на 13–30% (табл. 3).

Вміст міді та цинку, як важких металів, у вині має знаходитися на оптимально низькому рівні. Він може підвищуватися внаслідок використання бордоської рідини та інших фунгіцидів [10]. Застосування препарату АгроМар сприяє зниженню вмісту цинку та міді у вині на 16–50%, більш суттєво у 2017 році. Це є додатковою перевагою використання біопрепарату з урахуванням покращення органолептичних якостей вина за його дії.

Обробка препаратом АгроМар підвищує якість соку винограду, а саме підвищення цукристості та зниження кислотності протягом 2-х років у обох сортів, як у білому так і червоному.

Обробка препаратом АгроМар покращує органолептичні показники якості вина – колір, смак та аромат, які підвищують дегустаційну оцінку білого вина на 0,1 бала, червоного – на 0,6 та 1,0 бали у 2016 та 2017 рр., відповідно.

Обробка біопрепаратом підвищує вміст заліза та марганцю на 13–38% у білому вині з винограду Ароматний та червоному вині з винограду Каберне Совіньйон, а також знижує до двох разів вміст важких металів цинку та міді.

Таким чином, можна стверджувати, що біопрепарат АгроМар позитив-



но впливає на якість соку та вина з винограду Ароматний та Каберне Совіньйон, а також покращує мікроелементний склад вина.

**Вдячність:** Автори висловлюють щирю вдячність **Кучер Галині Михайлівні**, кандидату біологічних наук, провідному науковому співробітнику Національного наукового центру «Інституту виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова», за допомогу в організації польових досліджень, за підтримку та натхнення.

**М. А. Lopukhova<sup>1</sup>, О. В. Pauzer<sup>1</sup>, І. Р. Yakuba<sup>1</sup>, М. М. Artyukh<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Odesa National Mechnikov University, 2, Dvorianska str., Odesa, Ukraine,  
e-mail: marilopuhova@gmail.com

<sup>2</sup> National Scientific Center "V. Ye. Tairov Institute of Viticulture and Wine-making", 27,  
40 Let Pobedy Str., Tairovo, Odessa 65496, Ukraine

## QUALITY OF JUICE AND WINE MADE OF GRAPE VARIETIES AROMATNY AND CABERNET SAUVIGNON AFTER TREATMENT OF VINES BY BIOPREATION AGROMAR

### Summary

**Aim.** The purpose of this work was to find out the effect of processing of grape plants by the biopreparation AgroMar on the quality of wine materials and wine of varieties Aromatny and Cabernet Sauvignon. **Methods.** The biopreparation "AgroMar" is a biophigicide made of *Trichoderma lignorum*, which has a triple biological spectrum of action: bio-protection, biostimulation and bio-fertilizer. The research was conducted in 2016–2017 in the vineyards and laboratory of physiology of the reproduction center National Scientific Center "V. Ye. Tairov Institute of Viticulture and Wine-making". The field experiments were conducted on technical varieties Aromatny and Cabernet Sauvignon. During the growing season, the experimental vines were sprayed with a solution of AgroMar at the concentration of 0.3 l / 10 liters of water (fine spraying with a manual sprayer), four times. The harvest was carried out in the first decade of September. The sugar content of the grape juice was determined by Bertrand's method, acidity – by titrometric method. The wine is made on the basis of the winery of National Scientific Center V.E. Tairov Institute. The tasting evaluation of the quality of wine was carried out by the tasting commission of the V. E. Tairov Institute. The metal content was determined by the method of atomic absorption spectrophotometry. **Results.** It was shown that processing by AgroMar improves the quality of juice, namely, increasing the sugar content and reducing the acidity for 2 years in both varieties, both in the juice out of white grapes Aromatny and in red grapes Cabernet Sauvignon. AgroMar treatment improves the organoleptic quality of wine, such as color, flavor and aroma, which raise the tasting grade of white wine by 0.1 point, red – by 0.6 and 1.0 points in 2016 and 2017, respectively. Biopreparation increases iron and manganese content in the white wine from Aromatny grapes and red wine from Cabernet Sauvignon grapes, and also reduces the content of heavy metals zinc and copper up to two times. **Conclusions.** It can be argued that biopreparation AgroMar positively affects the quality of juice and wine, as well as improves the microelement composition of the wine.



**Key words:** Cabernet Sauvignon, Aromatniy, biofungicide AgroMar, iron, micronutrients.

М. А. Лопухова<sup>1</sup>, О. Б. Паузер<sup>1</sup>, И. П. Якуба<sup>1</sup>, М. М. Артюх<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
Дворянская, 2, Одесса, Украина

<sup>2</sup> Национальный научный центр “Институт виноградарства и виноделия  
им. В. Е. Таирова” ул. 40 лет Победы, 27, ПГТ Таирова, Одесса, Овидиопольский  
р-н, Одесская обл., 65496, Украина, e-mail: marilopuhova@gmail.com

## КАЧЕСТВО СОКА И ВИНА ИЗ ВИНОГРАДА АРОМАТНЫЙ И КАБЕРНЕ-СОВИньОН ПРИ ОБРАБОТКЕ ЛОЗЫ БИОПРЕПАРАТОМ АГРОМАР

### Реферат

**Цель.** Целью работы было выяснить влияние обработки растений винограда биопрепаратом “АгроМар” на качество сока и вина сортов Ароматный и Каберне Совиньон. **Методы.** Препарат “АгроМар” – биофугицид на основе *Trichoderma lignorum*, обладающий тройным биологическим спектром действия биозащита, биостимуляция и биоудобрение. Исследования проводились в 2016–2017 гг. в виноградниках и лаборатории физиологии отдела размножения ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова». Полевые опыты проводили на технических сортах Ароматный и Каберне Совиньон. В период вегетации опытные кусты опрыскивали раствором АгроМар в концентрации 0,3 л / 10 л воды (мелкодисперсное опрыскивание), четыре раза. Сбор урожая проводили в первой декаде сентября. Сахаристость сока винограда определяли методом Бертрана. Кислотность титриметрическим методом. Вино изготовлено на базе винзавода Института им. В. Е. Таирова. Содержание металлов определяли методом атомноабсорбционной спектrophотометрии. **Результаты.** Показано, что обработка АгроМаром повышает качество сока, а повышенная сахаристости и снижая кислотность в течение 2-х лет в обоих сортов, как в белом из винограда Ароматный, так и красном с Каберне Совиньон. Обработка АгроМаром улучшает органолептические показатели качества вина – цвет, вкус и аромат, которые повышают дегустационный оценку белого вина на 0,1 балла, красного – на 0,6 и 1,0 балла в 2016 и 2017, соответственно. Обработка биопрепаратом повышает содержание железа и марганца в белом вине из винограда Ароматный и красном вине из винограда Каберне Совиньон, а также снижает до двух раз содержание тяжелых металлов цинка и меди. **Выводы.** можно утверждать, что биопрепарат АгроМар положительно влияет на качество сока и вина, а также улучшает микроэлементный состав вина.

**Ключевые слова:** Каберне Совиньон, Ароматный, биофугицид АгроМар, железо, микроэлементы.



### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *АгроМар* [Електронний ресурс]: [Веб-сайт]. – Електронні дані. – Київ: 2017. – Режим доступу: [https:// www.agromar.com.ua/ru/biopreparat-agromarr.html](https://www.agromar.com.ua/ru/biopreparat-agromarr.html) (дата звернення 03.08.2018).
2. *Белчгазі В. Й., Данканич Т. К.* Вплив міді на ріст і розвиток винограду // Науковий вісник Ужгородського університету: Серія: Біологія. – Ужгород: Видавництво УжНУ «Говерла», 2011. – Вип. 30. – С. 164–166.
3. *Sala F., Blidariu C.* Macro- and Micronutrient Content in Grapevine Cordons under the Influence of Organic and Mineral Fertilization // Bulletin UASVM Horticulture, 2012. – №69(1) – P. 318–324.
4. *McDonald, J. H.* Handbook of Biological Statistics, 3rd ed. Baltimore, Maryland: Sparky House Publishing, 2014. – 305 p.
5. *Ермаков А. И.* Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, Ленингр. отд-ние, 1987. – 430 с.
6. *Кучер Г. М., Артюх М. М., Нікульча Є. В.* Вплив біопрепаратів на якість урожаю та виноматеріалів винограду сорту Каберне Совіньйон // Виноградарство і виноробство: міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Одеса: ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», 2013. – Вип. 50. – С. 145–150.
7. *Лопухова М. А., Кучер Г. М., Паузер О. Б., Якуба І. П.* Фізіологічні показники та врожайність винограду сортів Ароматний та Каберне Совіньйон за обробки АгроМаром // Вісник ОНУ. Сер.: Біологія. – 2018. – Т. 23, вип. 14. – С. 10–20.
8. *Мойсієнко В. В., Надточій Н. П.* Важкі метали в ґрунтах та кормових фітоценозах Полісся // Карантин і захист рослин. – 2004. – № 12. – С. 10–12.
9. *ГОСТ 30178-96* Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов. Режим доступу: <http://docs.cntd.ru/document/gost-30178-96>. (дата звернення 10.10.2018).
10. *Avram V., Voica C., Hosu A., Cimpou C., Măruțoiu C.* ICP–MS characterization of some Roumanian white wines by their mineral content // Rev. Roum. Chim., 2014. – № 59(11–12). – P. 1009–1019.
11. *Pittman J. K.* Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. // New Phytol, 2005. – № 167. – P. 733–742.

### References

1. AgroMar.- Kyiv (Aug. 03.2017).[https:// www.agromar.com.ua/ru/biopreparat-agromarr.html](https://www.agromar.com.ua/ru/biopreparat-agromarr.html) (in Russian)
2. Belchgazi VY, Dankanich TK The effect of cuprum on the growth and development of grapes. Science Bulletin of Uzhgorod University: Seriya: Biologiya. 2011; (30): 164–166. (in Ukrainian)
3. Sala F, Blidariu C Macro- and Micronutrient Content in Grapevine Cordons under the Influence of Organic and Mineral Fertilization. Bulletin UASVM Horticulture. 2012; 69(1): 318–324.
4. McDonald, J.H. Handbook of Biological Statistics, 3rd ed. Baltimore, Maryland: Sparky House Publishing, 2014:305 p.
5. Ermakov AI Methods of biochemical studies of plants. L.: Agropromizdat, Leningr. department, 1987: 430p. (in Russian)



6. Kucher GM, Artyukh MM, Nikulcha CV Effect of biopreparations on the quality of harvest and wine materials of grapes Cabernet Sauvignon. Viticulture and wine making: mizhvidomchy thematic naukovy zbirnik. Odesa: NSC "IVIV Sim. V.Є. Taïrova ", 2013; (50):145-150. (in Ukrainian)
7. Lopukhova MA, Kucher GM, Pauzer, OB, Yakuba IP Physiological indicators and yield of grape varieties Aromatniy Cabernet Sovinion at foliar treatment with AgroMar. Visnyk ONU. Ser . Biologiya,2018.; 23(14):10-20. (in Ukrainian)
8. Moisienko VV, Nadtochiy NP Heavy metals in soils and forest ecosystems Polissya. Quarantine and Zakhist Roslin, 2004; (12):10–12. (in Ukrainian)
9. GOST 30178-96 Raw material and food-stuffs. Atomic absorption method for determination of toxic elements: <http://docs.cntd.ru/document/gost-30178-96>. (referred 10.10.2018). (in Russian)
10. Avram V, Voica C, Hosu A, Cimpou C, Măruțoiu C ICP–MS characterization of some Roumanian white wines by their mineral content. Rev. Roum. Chim., 2014; 59(11–12):1009–1019.
11. Pittman, JK, Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. New Phytol, 2005(167):733–742.

Стаття надійшла до редакції 10.09.2018 р.





**Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук, З. Я. Федорович,  
З. Д. Воробець**

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,  
вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна,  
e-mail: lavrykgal@gmail.com

## **NO-СИНТАЗНА АКТИВНІСТЬ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА ACNE VULGARIS**

**Мета.** Вивчити зміни активності окремих ізоформ NO-синтази лейкоцитів крові осіб з *acne vulgaris* за участі біоплівкових і планктонних форм стафілококів. Активність ензиму визначали до та після лікування. **Методи.** Обстежено 44 хворих на *acne vulgaris*, з гнійних пустул яких ізольовано культури плівкоутворювальних і планктонних форм *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus epidermidis*. Лейкоцити виділяли з свіжоотриманої периферичної гепаринізованої крові пацієнтів (до і після лікування) та осіб групи контролю у градієнті густини фікол-тріумбасту ( $\rho=1,08$  г/см<sup>3</sup>). NO-синтазну активність виражали в пмоль цитруліну за 1 хв на 1 мг протейну. **Результати.** Виявлено децю вищі показники iNOS лейкоцитів за участі біоплівкових стафілококів для видів *S. aureus* та *S. epidermidis* у порівнянні з показниками планктонних форм вказаних видів. Встановлено, що при формах акне, спричиненого як *S. aureus*, так і *S. epidermidis* (планктонна та плівкоутворювальна), достовірно збільшення активності в 3,8–5,2 рази ендотеліальної ізоформи NO-синтази та в 52,5–55,1 разів індукцйбельної NO-синтази лейкоцитів периферичної крові щодо контрольних значень. Після проведеного курсу лікування акне, ускладненого проліферацією *S. aureus* (планктонна та плівкоутворювальна форма), достовірно знижується активність індукцйбельної ізоформи NO-синтази відносно контрольного рівня. **Висновки.** За виявлення біоплівкових стафілококів видів *S. aureus* та *S. epidermidis* зафіксовано збільшення рівня активності iNOS. При обох формах акне, спричиненого як *S. aureus*, так і *S. epidermidis* (планктонна та плівкоутворювальна), збільшується активність ізоформ NO-синтази. Активність індукцйбельної ізоформи NO-синтази може слугувати біомаркером для моніторингу ефективності лікування.

**Ключові слова:** хворі на *acne vulgaris*, ендотеліальна NOS, індукцйбельна NOS, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Серед захворювань шкіри вугрова хвороба (*acne vulgaris*) є одним з найпоширеніших запальних, хронічних, захворювань пілосебоцейного комплексу, які викликають рецидив з локалізацією на обличчі і верхній частині тулуба. [11].

Відомо, що у таких хворих спостерігаються глибокі зміни кількісного



та якісного складів мікробіоти шкіри, тому варіації бактеріальної колонізації є одним з основних елементів у його розвитку. Приєднання мікроорганізмів втягує у патологічний процес лейкоцити периферичної крові [2]. При запаленні, викликаному пошкодженням тканин шкіри або інфекцією, макрофаги первинної імунної відповіді визначаються як запальний M1-фенотип. Активний кисень і проміжні продукти метаболізму азоту, включаючи оксид азоту (NO) і супероксид, які утворюються M1-макрофагами, мають високу токсичність для мікроорганізмів та можуть призводити до аномального запалення сусідніх тканин [17]. Проте прозапальні і антимікробні M1-відповіді макрофагів контролюються M2-відповідями протизапальних макрофагів. У ході подальшого розвитку імунної відповіді в результаті кооперативних запальних механізмів, фактор запалення або патоген елімінуються, M1-активація макрофагів зменшується, відбувається накопичення протизапальних M2-макрофагів в заключній, відновлювальній стадії запалення. Набуваючи регуляторно-супресивного фенотипу макрофаги контролюють відновлення базового тканинного гомеостазу [1].

Макрофаги обох фенотипів часто присутні в тканинах одночасно і відрізняються спектром медіаторів і маркерів, які ними секретуються. Інтегративний ефект M1- і M2-макрофагів залежить від балансу їхніх функцій – активувальних і пригнічувальних, а також від тканинного мікрооточення [16].

Встановлено, що при різних захворюваннях переважання певних фенотипів макрофагів може сприяти небажаним ефектам у перебігу захворювань хронізації чи розвитку фатальної для організму надмірної запальної відповіді [9].

Впродовж останніх десятиріч значна увага приділяється вивченню метаболізму оксиду азоту в патогенезі різноманітних захворювань. Оскільки макрофаги M1 експресують NO-синтазу (NOS), яка метаболізує аргінін в NO і цитрулін, а макрофаги M2 характеризуються експресією ферменту аргінази, який гідролізує аргінін до орнітину і сечовини [18] використовують біохімічні методи для визначення поляризації макрофагів, що засновані на активності їх ферментів щодо розщеплення аргініну [6].

Окрім *Propionibacterium acnes* до запального процесу при вугровій хворобі приєднується інша бактеріальна мікрофлора (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Haemophilus spp.*, *Escherichia coli* та ін.) [3]. За умов утворення мікроорганізмами біоплівки більш вираженою стає обтурація потових залоз, що має значення в патогенезі атопічного дерматиту, а також *acne vulgaris* [13]. Виявлено, що найчастіше до розвитку акне задіюється *S. aureus*, який спричинює більш високу фагоцитарну активність та міграційну здатність M1-макрофагів. [9].

За даними наукової літератури доведено, що в мікробіоті кишечника у пацієнтів з акне різко зменшується кількість *Lactobacillus*, зростає популяційний рівень *S. aureus* та зростає роль *E. coli haemolytica* [13].

Попередніми нашими дослідженнями встановлено високий відсоток виділення із гнійних пустул пацієнтів з *acne vulgaris* стафілококів як біоплівкової, так і планктонної форми [5]. Оскільки вугрову хворобу розглядають як порушення функції всього організму із задіюванням імунної системи в цьому



процесі [4], актуальними є проведення біохімічних досліджень, а саме вивчення зміни активності окремих ізоформ NO-синтази на пермеалізованих сапоніном мононуклеарних лейкоцитів периферичної крові хворих на акне.

Ефективність лікування вугрової хвороби на сьогодні залишається недостатньою і потребує комплексних підходів.

**Мета роботи:** вивчити зміни активності окремих ізоформ NO-синтази лейкоцитів крові осіб з *acne vulgaris* за участі біоплівкових і планктонних форм стафілококів. Активність ензиму визначали до та після лікування.

### Матеріали та методи

Досліджено 44 хворих на *acne vulgaris* віком від 18 до 30 років, з гнійних пустул яких ізольовано культури плівкоутворювальних і планктонних форм *S. aureus* та *S. epidermidis*. Виділення та ідентифікацію стафілококів проводили з використанням стандартних середовищ у лабораторії кафедри мікробіології ЛНМУ ім. Данила Галицького відповідно до наказу [12]. Референтний штам *S. aureus* ATCC 25923 (F-49) отримано з музейної колекції бактеріологічної лабораторії Львівського обласного лабораторного центру для контрольного показника біоплівки.

Здатність до плівкоутворення у відібраних штамів було визначено за культуральними властивостями (підвищена в'язкість біомаси колонії) та за допомогою диференціальної інтерференційно-контрастної мікроскопії (DIC) з використанням конденсора темного поля та флуоресцентної мікроскопії [15].

Мононуклеарні лейкоцити виділяли з свіжоотриманої периферичної гепаринізованої крові пацієнтів (до і після лікування) та осіб групи контролю ( $n=9$ ) у градієнті густини фікол-тріумбасту ( $\rho=1,08$  г/см<sup>3</sup>). Визначення сумарної NO-синтазної ензиматичної активності (eNOS + iNOS) сапонін-перфорованих лейкоцитів проводили у відповідності з методом, описаним Раваєвою М. Ю. і Чуян О.М. [8]. Інкубаційна суміш (1 мл) містила 50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,0), 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 2 мМ L-аргінін, 1 мМ NADPH(H<sup>+</sup>) (Sigma, USA). NO-синтазну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти лейкоцитарної суміші (60–80 мкг/мл). Інкубацію проводили протягом 60 хв за температури 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням до інкубаційного середовища 0,3 мл 2N  $\text{HClO}_4$ . Контрольні зразки, що містили всі компоненти інкубаційного середовища, попередньо денатурували 2N  $\text{HClO}_4$ . Суміш центрифугували 10 хв при 3500 g і супернатант використовували для визначення L-цитруліну високоспецифічним методом в кольоровій реакції з антипірином. Дослідні та контрольні проби спектрофотометрували при 456 нм. Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної iNOS визначали подібним методом, однак замість 2мМ  $\text{CaCl}_2$  в середовище інкубації додавали 2 мкМ EDTA. Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної ізоформи NOS, яка відповідає конститутивній ізоформі (cNOS), вираховували як різницю між загальною NO-синтазною активністю та активністю iNOS. NO-синтазну активність виражали в пмоль цитруліну зі 1 хв на 1 мг протеїну.

Усім хворим проводився курс вакцинотерапії автостафілококовою вакциною та пробіотичним препаратом «Лацидофіл» (Institut Rosell Inc., Канада)



для посилення імуномодельовального ефекту.

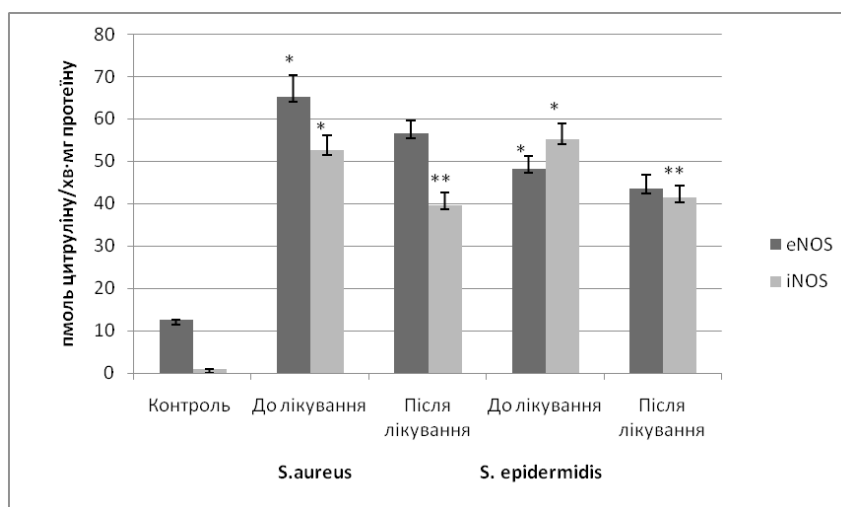
Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне значення ( $M$ ), стандартну похибку ( $m$ ). Достовірність змін встановлювали за  $t$ -критерієм Ст'юдента.

### Результати та обговорення

З гнійних пустул хворих ( $n=44$ ) виділено 28 штамів (63,6%) стафілококів, що утворювали плівки, з них 15 штамів (53,6%) віднесено до *S. aureus* і 13 штамів (46,4%) – до *S. epidermidis*.

Хоча всі ізоформи NOS каталізують утворення NO, кожна з них має свої особливості як у механізмах дії та локалізації, так і у біологічному значенні для організму і визначаються як конститутивна (сNOS) та індукцибельна (іNOS) синтази оксиду азоту. Підвищений рівень NO та його дефіцит є шкідливим для організму. За даними науковців високий рівень NO – це основний фактор у розвитку патологічних станів організму та посилення їх запального процесу [7].

Встановлено, що в лейкоцитах крові практично здорових осіб активність ендотеліальної ізоформи NO-синтази (eNOS) складає  $12,5 \pm 0,1$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну, а активність індукцибельної ізоформи (іNOS) ледве визначається і становить  $1,0 \pm 0,1$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну (рис. 1).



**Рис. 1. Активність окремих ізоформ NO-синтази лейкоцитів крові хворих на *acne vulgaris* (плівкоутворювальна форма стафілококів)**

\*  $p < 0,001$  – зміни достовірні щодо величин в осіб групи контролю (практично здорові донори); \*\*  $p < 0,05$  – зміни достовірні щодо показників іNOS у пацієнтів до лікування

**Fig. 1 The activity of distinct isoforms of NO-synthase of blood leukocytes in patients with *acne vulgaris* (film-forming type of staphylococci)**

\*  $p < 0,001$  – statistically significant relative to the values in the control group (practically healthy donors); \*\*  $p < 0,05$  – statistically significant relative to iNOS indices the untreated patients



За результатами наших досліджень виявлено значне зростання рівнів iNOS (у кілька десятків разів) у хворих на вугрову хворобу на тлі стафілококового ураження шкіри у порівнянні із практично здоровими особами. Показники iNOS у хворих акне становили в межах  $55,1 \pm 3,7$ ... $41,4 \pm 3,9$   $1,0 \pm 0,1$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну проти контрольних даних  $1,0 \pm 0,1$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну.

Порівнюючи показники iNOS лейкоцитів хворих на акне (біоплівкова та планктонна форма стафілококів), дещо вищі показники iNOS лейкоцитів зафіксовано за участі біоплівкових стафілококів для видів *S. aureus* та *S. epidermidis* відповідно  $52,5 \pm 3,6$  та  $55,1 \pm 3,7$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну. При виділенні планктонних форм вказаних видів стафілококів показники iNOS лейкоцитів становили  $49,3 \pm 4,5$  та  $41,4 \pm 3,9$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну. Оскільки eNOS, виконуючи фізіологічні функції, забезпечує підтримання гомеостазу в організмі, її рівень не є високим у контрольній групі –  $12,5 \pm 0,1$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну, проте рівень в лейкоцитах пацієнтів з акне є вищим у 4–5 разів як за участі біоплівкової, так і планктонної форми стафілококів.

*S. epidermidis* є представником автохтонної мікробіоти, присутній в організмі у різних біотопах і виконує одну з важливих функцій – захист організму від мікробних патогенних чинників, у тому числі, через реалізацію «постійного тренінга» імунної системи. Одним із аспектів цього процесу є підтримка на відповідних рівнях eNOS. За умов розвитку *acne vulgaris* в організмі активуються механізми протиінфекційного імунітету, тому є дещо підвищена імунна відповідь на опортуністичні мікроорганізми.

У пацієнтів хворих на акне (плівкоутворювальна форма *S. aureus*) активність eNOS лейкоцитів до початку лікування становила  $65,1 \pm 5,2$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну, тобто була в 5,2 рази більшою ( $p < 0,001$ ), а активність iNOS становила до  $52,8 \pm 3,6$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну, тобто в 52,5 рази перевищувала ( $p < 0,001$ ) відповідні показники ензиму у контрольних осіб. Після проведеного лікування активність eNOS дещо знижувалася щодо показників до лікування –  $56,5 \pm 3,1$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну, однак це зниження не було достовірним ( $p > 0,05$ ). Що стосується iNOS, то її активність знижувалася більш суттєво і становила  $39,6 \pm 3,1$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну – зміна показника в 1,3 рази ( $p < 0,05$ ) відносно вихідного рівня ензиму.

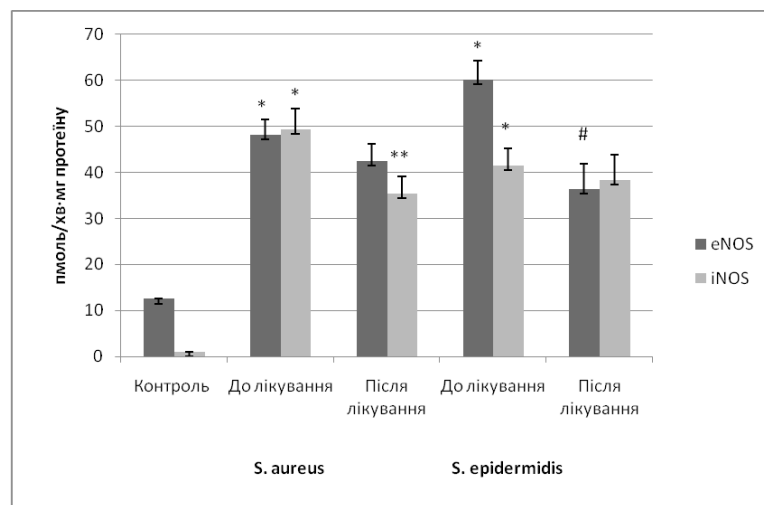
У пацієнтів, хворих на акне, ускладнене проліферацією плівкоутворювальної форми *S. epidermidis*, активність eNOS лейкоцитів до початку лікування становила  $48,2 \pm 3,0$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну, тобто була вищою у 3,8 рази щодо показників активності здорових осіб ( $p < 0,001$ ). Ще більш виражені зсуви показників у бік підвищення встановлено для iNOS  $55,1 \pm 3,7$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну, тобто в 55,1 рази ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з контролем. За результатами проведеного лікування активність eNOS незначно відрізнялася щодо показників до лікування. Зафіксовано дещо нижчі рівні –  $43,5 \pm 3,4$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну ( $p > 0,05$ ). Після проведеного лікування активність iNOS знижувалася достовірно щодо такої до лікування і становила  $41,3 \pm 2,9$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну, тобто в 1,3 рази ( $p < 0,05$ ).

Дослідження NO-синтазної активності лейкоцитів пацієнтів хворих на





акне, від яких виділяли планктонну форму *S. aureus*, засвідчує аналогічний тренд показників ( $48,2 \pm 3,4$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну,  $p < 0,001$ ). Активність iNOS, індукована в результаті запальних реакцій, спричинених вказаним видом, також сягала високих показників ( $49,3 \pm 4,5$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну), тобто була більшою в 49,3 рази ( $p < 0,001$ ), як і за умов виділення біоплівкової форми *S. aureus* (рис. 2). Під впливом лікування зафіксовано деяке зниження активності eNOS лейкоцитів ( $42,4 \pm 3,8$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну) ( $p > 0,05$ ). Зниження iNOS було достовірним і становило  $35,4 \pm 3,8$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну, тобто в 1,4 рази ( $p < 0,05$ ) відносно показників ензиму до лікування.



**Рис. 2. Активність окремих ізоформ NO-синтази лейкоцитів крові пацієнтів хворих на *acne vulgaris* (планктонна форма стафілококів)**

\*  $p < 0,001$  – зміни достовірні щодо величин в осіб групи контролю (практично здорові донори); \*\*  $p < 0,05$  – зміни достовірні щодо показників iNOS у пацієнтів до лікування; #  $p < 0,01$  – зміни достовірні щодо показників eNOS у пацієнтів до лікування

**Fig. 2. The activity of distinct isoforms of NO-synthase of blood leukocytes in patients with *acne vulgaris* (planktonic type of staphylococci)**

\*  $p < 0,001$  – statistically significant relative to the values in the control group (practically healthy donors); \*\*  $p < 0,05$  – statistically significant relative to iNOS indices the untreated patients; #  $p < 0,01$  – statistically significant relative to eNOS indices the untreated patients

У пацієнтів хворих на акне, від яких ізольовано планктонну форму *S. epidermidis*, активність eNOS лейкоцитів до початку лікування становила  $60,1 \pm 4,1$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну, тобто перевищувала контрольні значення в 4,8 рази ( $p < 0,001$ ), а активність iNOS –  $41,4 \pm 3,9$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну, тобто в 41,4 рази більша ( $p < 0,001$ ) за відповідні показники контрольних значень. Після проведеного лікування активність eNOS суттєво знижувалася щодо показників до лікування – до  $36,3 \pm 5,5$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну, тобто в 1,7 рази ( $p < 0,01$ ). Що стосується iNOS, то її активність практично не знижувалась щодо такої до лікування і становила  $38,3 \pm 5,6$  пмоль цитруліну/хв $\times$ мг протеїну ( $p > 0,05$ ).





Такі високі значення активності у декілька десятків разів індукцйбельної NO-синтази лейкоцитів периферичної крові хворих на акне до розвитку якого задіюються плівкоутворювальної і планктонної форми стафілокока, вказують на їхню важливу роль у розвитку запального процесу на шкірі.

Нещодавні результати показують, що кількісні показники стафілококів зростають у процесі наростання клінічних проявів акне [14]. Отже, вугрова хвороба може спричинятися стафілококами з високим потенціалом до плівкоутворення, що сприяє рецидивуванню хвороби і є однією з причин низької ефективності протимікробної терапії. При цьому біоплівки високої щільності утворює як культура вірулентна (*S. aureus*), так і умовно-патогенна бактерія (*S. epidermidis*). Здатність до плівкоутворення є важливою властивістю як для потенційних патогенів (зокрема, золотистого й епідермального стафілококів), так і для нормальних симбіонтів людського організму, що сприяє виживанню їхньої популяції з різними наслідками для організму людини [5]. Відтак, плівкоутворення розглядають як додатковий фактор патогенності мікроорганізмів [10], і важливість якого зростає у разі зниження реактивності імунної системи.

Наші дані також погоджуються з такими, що свідчать про наявність оксидативного та нітрозативного стресу при акне. Так, показано, що при акне зростає концентрація малонового діальдегіду та нітроген оксиду і одночасно знижується активність антиоксидантних ензимів – супероксиддисмутази та каталази [12].

Під впливом комплексної терапії (введення аутовакцини та застосування пробіотиків), на тлі незначної зміни активностей eNOS, встановлено значний вплив на кількісний показник iNOS. Причому більш виражений ефект зафіксовано у пацієнтів зі шкіри яких була виділена біоплівкова форма *S. aureus*, і меншою мірою від хворих з планктонною формою *S. aureus*.

Оскільки отримані нами дані свідчать про те, що активність індукцйбельної ізоформи NO-синтази в лейкоцитах при акне, як при планктонній, так і при плівкоутворювальній формі, зростає більш як у 50 разів, що визначається як нітрозативний стрес, можна припустити, що активність цього ензиму може слугувати маркерним показником для характеристики активності патологічного процесу та ефективності терапії акне.

Результати проведених досліджень підтвердили тісний зв'язок між активністю стафілококів шкіри при акне, як бактеріального фактора, що індукуює розвиток запальних реакцій в організмі із залученням механізмів NO синтазної системи мононуклеарних лейкоцитів. Хоча основним джерелом оксиду нітрогену є індукцйбельна NO-синтаза, при *acne vulgaris*, спричиненому як *S. aureus*, так і *S. epidermidis* незалежно від того, яку форму було виявлено (плівкоутворювальну чи планктонну), макрофагами активно експресується ендотеліальна ізоформа NO-синтази.

Активність вказаної конститутивної ізоформа NO-синтази знаходиться у позитивній кореляції з ідуцибельною NO-синтазою, що виявлено при акне спричиненого *S. aureus* (планктонна та плівкоутворювальна форма), активність якої багаторазово зростає щодо контрольних значень і достовірно знижується після проведеного курсу лікування. Оскільки на індукцію запальної

реакції більшою мірою впливає біоплівкова форма золотистого стафілокока, вірогідно у її структурах присутні компоненти, які впливають на рівень запальної реакції

Лікувальний ефект імунотерапії із застосуванням автовакцини, ґрунтується, як відомо, на імунофізіологічному впливові та мобілізації імунної відповіді за умов активної бактеріальної інфекції, а застосування пробіотичних бактерій сприяє реалізації протибактеріального захисту, що засвідчило альтерацію показників NO-синтазної системи мононуклеарних лейкоцитів.

Таким чином, активність індукцйбельної ізоформи NO-синтази може слугувати біомаркером і використовуватися для оцінки ефективності лікування при станах, що супроводжуються активацією патогенних чи опортуністичних мікроорганізмів, зокрема і при *acne vulgaris*.

Г. С. Лаврик, О. П. Корнейчук, З. Я. Федорович,  
З. Д. Воробець

Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого,  
ул. Пекарская, 69, Львов, 79010, Украина,  
e-mail: lavrykgal@gmail.com

## NO-СИНТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ *ACNE VULGARIS*

### Реферат

**Цель.** Изучить изменения активности эндотелиальной и индуцибельной NO-синтаз лейкоцитов крови лиц с *acne vulgaris* с участием биоплёночных и планктонных форм стафилококков. Активность фермента определяли до и после лечения. **Методы.** Обследовано 44 больных с *acne vulgaris*, из гнойных пустул которых изолированы культуры биоплёночных и планктонных форм *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*. Лейкоциты выделяли из периферической гепаринизированной крови пациентов (до и после лечения) и лиц группы контроля в градиенте плотности фикал-триумбасту ( $\rho = 1,08 \text{ г / см}^3$ ). NO-синтазную активность выражали в пмоль цитруллин за 1 мин на 1 мг протеина. **Результаты.** Выявлено, что показатели индуцибельной NOS лейкоцитов с участием биоплёночных стафилококков для видов *S. aureus* и *S. epidermidis* несколько выше по сравнению с показателями планктонных форм указанных видов стафилококков. Установлено, что при формах акне, вызванного как *S. aureus*, так и *S. epidermidis* (планктонная и пленкообразующая), достоверное увеличение активности в 3,8–5,2 раза эндотелиальной изоформы NO-синтазы и в 52,5–55,1 раза индуцибельной NO-синтазы лейкоцитов периферической крови относительно контрольных значений. После проведённого курса лечения акне, осложнённого пролиферацией *S. aureus* (планктонная и пленкообразующая форма), достоверно снижается активность индуцибельной изоформы NO-синтазы относительно контрольного уровня. **Вывод.** При выявлении биоплёночных стафилококков видов *S. aureus* и *S. epidermidis* зафиксировано увеличение уровня активности индуцибельной NOS. При обеих формах акне, вызванного как *S. aureus*, так и *S. epidermidis* (планктонная и пленкообразующая), увеличивается



активність ізоформ NO-синтаз. Активність індукцйбельної ізоформи NO-синтази може служити біомаркером для моніторинга ефективності лічення.

**Ключевые слова:** *больные acne vulgaris, эндотелиальная NOS, индуцибельная NOS, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis.*

**G. Lavryk, O. Korniychuk, Z. Fedorovych, Z. Vorobets**

Danylo Halytsky Lviv National Medical University,  
69, Pekarska St., Lviv, 79010, Ukraine,  
e-mail: lavrykgal@gmail.com

## NO-SYNTHASE ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH *ACNE VULGARIS*

### Summary

The **aim** is to study changes in the activity of distinct NO-synthase isoforms of blood lymphocytes in persons with acne vulgaris, for those individuals with disease accompanied by seeding of film-forming and planktonic staphylococcus forms. Enzyme activity was determined both before and after treatment. **Methods.** 44 patients with acne vulgaris were studied, for that persons the cultures of film-forming and planktonic forms of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* were isolated from purulent pustules. Separation of lymphocytes from fresh peripheral heparinized blood of patients (before and after treatment) and individuals in the control group was done in the ficol triumbras ( $\rho=1.08 \text{ g/cm}^3$ ). NO-synthase activity was expressed as citrulline production in picomoles per 1 milligram of protein per 1 minute. **Results.** Slightly higher rates of leukocyte iNOS were detected with the participation of biofilm staphylococci for *S. aureus* and *S. epidermidis* species compared to the planktonic forms of these staphylococcal species. For the acne caused both by *S. aureus* and *S. epidermidis* (planktonic and film-forming form) it was shown the significant increase of endothelial NO-synthase activity (3.8–5.2 times) and inducible NO-synthase activity (52.5–55.1 times) of peripheral blood leukocytes compared to control. The activity of the inducible isoform NO synthase significantly decreases relative to the control level after the course of acne treatment complicated by the proliferation of *S. aureus* (planktonic and film-forming form). **Conclusions.** The increase in the activity level of iNOS was observed with the participation of biofilm staphylococci of *S. aureus* and *S. epidermidis* species. In both forms of acne caused by *S. aureus* and *S. epidermidis* (planktonic and film-forming), the activity of NO-synthase isoforms increases with respect to control values. The activity of the inducible isoform NO-synthase can serve as a biomarker for monitoring treatment efficacy.

**Key words:** *patients with acne vulgaris, endothelial NOS, inducible NOS, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis.*



### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Белова О. В., Зимина И. В., Торховская Т. И., Никитина Н. А., Сергиенко В. И. Иммунологическая функция кожи в свете новых данных // Российский иммунологический журнал. – 2015. – 9, № 2. – С. 155–163.
2. Горячкина М. В., Белоусова Т. А. Комбинированная терапия акне у женщин: поиск оптимальных решений // Вестник дерматологии и венерологии. – 2014. – № 2. – С. 90–95.
3. Калюжна Л. Д., Гречанська Л. В., Петренко А. В. Роль розсмоктувальної терапії в лікуванні хворих на акне // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2014. – 77, № 8. – С. 41–44.
4. Кутасевич Я. Ф., Маштакова И. А. Опыт лечения тяжелых форм угревой болезни // Український журнал, дерматології, венерології, косметології. – 2011. – № 3. – С. 66–72.
5. Лаврик Г. С., Корнійчук Г. С. Біоплівкова форма стафілококів у монота бівидовій культурі в поєднанні з лактобацилами // Біологічні студії/Studia Biologica. – 2015. – 9, № 3–4. – С. 89–98.
6. Монастырская Е. А., Лямина С. В., Мальшев И. Ю. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии // Патогенез. – 2008. – 6, № 4. – С. 31–39.
7. Пікас О. Б. Особливості дії оксиду азоту та його метаболітів в організмі людини, їх значення у виникненні патологічних процесів // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – 3, № 1. – С. 28–33.
8. Раваева М. Ю., Чуян Е. Н. Изменение активности системы синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения // Ученые записки Таврического национального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2011. – 24, № 4. – С. 201–210.
9. Сахаров В. Н. Роль различных фенотипов макрофагов в развитии заболеваний человека / В. Н. Сахаров, П. Ф. Литвицкий // Актуальные вопросы патофизиологии. – 2015. – № 1. – С. 26–31.
10. Сідашенко О. І., Воронкова О. С., Сірокваша О. А., Вінніков А. І. Біоплівка як особлива форма організації бактерій та її роль в інфекційних процесах // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – 2, № 3– С. 36–41.
11. Barratt H., Hamilton F., Car J., Lyons C., Layton A., Majeed A. Outcome measures in acne vulgaris: systematic review // British Journal of Dermatology. – 2009. – 160, № 1. – P. 132–136.
12. Bonne D. R., Garrity G. M., Castenholz R. W., Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes. – Springer-Verlag New York, 2009. – Vol. 3. – 1450 p.
13. Clark A. K. Edible Plants and Their Influence on the Gut Microbiome and Acne. Sivamani International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – 18, № 5. – P. 1070.
14. Dreno B., Martin R., Moyal D., Henley J.B., Khammari A., Seité S. Skin microbiome and acne vulgaris: Staphylococcus, a new actor in acne. Experimental dermatology. – 2017. – 26, № 9. – P. 798–803.
15. Krysko D. V., Berghe T. V., Parthoens E., D'Herde K., Vandenabeele P. Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their



clearance // *Methods in enzymology*. – 2008. – 442. – P. 307–341.

16. *Martinez F. O., Gordon S.* The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment // *F1000prime reports*. – 2014. – 6.

17. *Nathan C., Ding A.* Nonresolving inflammation // *Cell*. – 2010. – 140, № 6. – P. 871–882.

18. *Rath M., Müller I., Kropf P., Closs E.I., Munder M.* Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages // *Frontiers in immunology*. – 2014. – 5. – C. 532.

## References

1. *Belova OV, Zimina IV, Torhovskaya TI, Nikitina NA, Sergienko VI.* Immunologicheskaya funkciya kozhi v svete novyh dannyh. Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal. 2015;9(2):155–163. (in Russian)

2. *Goryachkina MV, Belousova TA.* Kombinirovannaja terapija akne u zhenshhin: poisk optimal'nyh reshenij. Vestnik dermatologii i venerologii. 2014;(2):90–95 (in Russian)

3. *Kalyujna LD, Grechanska LV, Petrenko AV.* Rol rozsmoktuvalnoi terapii v likuvanni hvoryh na acne. Klinichna Immunologiya. Alergologiya. Infektologiya, 2014; 77(8):41–44. (in Ukrainian)

4. *Kutasevich YaF, Mashtakova IA.* Opyt lecheniya tyazhelyh form ugrevoy bolezni. Ukrainskyi zhurnal, dermatolohii, venerolohii, kosmetolohii. 2011;(3):66–72. (in Ukrainian)

5. *Lavryk HS, Korniiichuk HS.* Bioplivkova forma stafilokokiv u monota bivydvonii kulturi v poiednanni z laktobatsylamy. Biolohichni studii/Studia Biologica. 2015;9(3–4):89–98. (in Ukrainian)

6. *Monastyrskaya EA, Lyamina CV, Malyshev IYu.* M1 i M2 fenotipy aktivirovannyh makrofagov i ih rol v immunnom otvete i patologii. Patogenez. 2008;6(4):31–39. (in Russian)

7. *Pikas OB.* Osoblyvosti dii oksydu azotu ta yoho metabolitiv v orhanizmi liudyny, yikh znachennia u vynyknenni patolohichnykh protsesiv. Visnyk problem biolohii i medytsyny. 2015;3(1):28–33. (in Ukrainian)

8. *Ravaeva MYu, Chuyan EN.* Izmenenie aktivnosti sistemy sinteza oksida azota pod deystviem nizkointensivnogo millimetrovogo izlucheniya. Uchenye zapiski Tavricheskogo nacionalnogo universiteta imeni V. I. Vernadskogo. Biologiya. Himiya. 2011;24(4):201–210. (in Ukrainian)

9. *Saharov VN.* Rol razlichnyh fenotipov makrofagov v razvitii zabolevaniy cheloveka. Aktualnye voprosy patofiziologii. – 2015;1:26–31. (in Russian)

10. *Sidashenko OI, Voronkova OS, Sirokvasha OA, Vinnikov AI.* Bioplivka yak osoblyva forma orhanizatsii bakterii ta yii rol v infektsiinykh protsesakh. Visnyk problem biolohii i medytsyny. 2013; 2(3):36–41. (in Ukrainian)

11. *Barratt H, Hamilton F, Car J, Lyons C, Layton A, Majeed A.* Outcome measures in acne vulgaris: systematic review. *British Journal of Dermatology*. 2009;160(1): 132–136. DOI:10.1111/j.1365-2133.2008.08819.x

12. *Bonne DR, Garrity GM, Castenholz RW, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes. Springer-Verlag New York, 2009; Vol. 3. 1450 p.



13. *Clark AK*. Edible Plants and Their Influence on the Gut Microbiome and Acne. *Sivamani International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(5), 1070. doi:10.3390/ijms18051070
14. *Dreno B, Martin R, Moyal D, Henley JB, Khammari A, Seité S*. Skin microbiome and acne vulgaris: Staphylococcus, a new actor in acne. *Experimental dermatology*. 2017;26(9):798-803. doi: 10.1111/exd.13296.
15. *Krysko DV, Berghe TV, Parthoens E., D'Herde K., Vandenabeele P*. Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. *Methods in enzymology*. 2008;442:307–341. doi: 10.1016/S0076-6879(08)01416-X.
16. *Martinez FO, Gordon S*. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*. 2014;6.
17. *Nathan C, Ding A*. Nonresolving inflammation. *Cell*. 2010;140(6):871–882.
18. *Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M*. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in immunology*. 2014;5:532.

Стаття надійшла до редакції 04.11.2018 р.





**Н. Ю. Васильєва<sup>1</sup>, К. Д. Крилова<sup>1</sup>, Й. Б. Кристофферсен<sup>2</sup>,  
О. А. Дубровіна<sup>1</sup>, В. О. Іваниця<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: [tatkamic@onu.edu.ua](mailto:tatkamic@onu.edu.ua)

<sup>2</sup> Інститут Морської біології, біотехнології та аквакультури,  
Грецький Центр Морських Досліджень, Гурнес 71500, 71003 Іракліон, Греція

## **МІКРОБНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ ПРИБЕРЕЖНИХ ВОД ОДЕСЬКОЇ ЗАТОКИ ЧОРНОГО МОРЯ**

**Метою** дослідження було визначення біорізноманітності прокариотної мікробіоти прибережної води Одеської затоки Чорного моря шляхом метагеномного аналізу. **Методи.** Проби морської води відбирали в районі гідробіологічної станції ОНУ імені І. І. Мечникова (46°26'28.2"N 30°46'20.0"E) з горизонту 100 см, фільтрували через 0,22 μm мембранні фільтри (Sartorius). Сумарну ДНК виділяли з зібраних мікроорганізмів за допомогою PowerWater DNA isolation kit (catalog no.14900-50-NF) згідно з інструкцією виробника (MO BioLabs). Для визначення мікробної різноманітності методами метагеномного аналізу використовували таргетне секвенування ділянки v4 гена 16S рРНК на платформі Illumina MiSeq. Отримані послідовності у форматі fastq аналізували в оболонці miniconda3 з послідовним використанням програм Fastqcv.0.11.2., Trimmomatic, Cutadapter, SPAdes, Centrifuge і Krona. **Результати.** В результаті метагеномного 16S рРНК аналізу в прибережних водах Одеської затоки було отримано 261197 анованих послідовностей. Виявлено представників основних відділів домену Bacteria: Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Verrucomicrobiota, Deferribacteres, Planctomycetes, Tenericutes, Aquificae, Deinococci, Thermotogae, Ignavibacteriales, Fibrobacteri. Найбільш поширеними відділами домену Bacteria є Proteobacteria (68,0%) і Bacteroidetes (19,0%). Серед відділу Proteobacteria переважають класи Gammaproteobacteria (63,0%) і Alphaproteobacteria (31,0%). Показано присутність незначної кількості представників домену Archaea (менше 0,5%) класів Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Crenarchaeota. **Висновки.** Порівняльний аналіз результатів, наведених і отриманих у попередніх дослідженнях біологічної різноманітності морської мікробіоти води Причорноморських лиманів і прибережних вод острова Зміїний дозволили визначити основні відмінності у їх складі. Показано, що здебільшого мікробіота морської води Одеської затоки як і Хаджибейського лиману та прибережної води острова Зміїний різноманітна і представлена в основному членами відділів Proteobacteria і Bacteroidetes, в той час як у Сухому і Дністровському лиманах переважають представники відділу Cyanobacteria.

**Ключові слова:** Одеська затока, Чорне море, морська вода, метагеномний 16S рРНК аналіз, мікробна біорізноманітність.



Чорне море це унікальна морська екосистема, у якій мікробіота визначає біогеохімічні процеси у всій водній товщі та формує фізико-хімічні умови для існування інших гідробіонтів. Мікробіологічні дослідження, проведені в другій половині ХХ століття, не дали достатньої інформації про таксономічний склад мікроорганізмів, що населяють прибережні та глибинні води Чорного моря. Більшість сучасних досліджень присвячено вивченню донних осадів [5], сульфатредукувальних бактерій [8, 16], зелених сірчаних бактерій [11, 15] і метанокиснювальних бактерій [12, 13].

Застосування біоінформативного аналізу сумарного геному дало можливість отримати уявлення про розподіл прокариотних мікроорганізмів, їх біологічну різноманітність та біогеохімічний потенціал морського мікробіому [6, 7, 14]. Так, наприклад, проведені метагеномні дослідження води Чорного моря пролили світло на таксономічний склад морських мікроорганізмів за горизонтального зонування [6]. Комплексними є дослідження Todorova с колегами, які присвячені вивченню мікробної різноманітності донних осадів Чорного моря біля берегів Болгарії – були найбільш цікавили у цьому сенсі [17].

Роботами мікробіологів Одеського національного університету імені І. І. Мечникова показано, що у воді біля острова Зміїний домен *Bacteria* представлений переважно відділом *Proteobacteria*, а також виявлено представників *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetes*, *Tenericutes*, *SRI*, *Fusobacteria* і *Firmicutes*. Досліджено склад мікробіоти причорноморських лиманів та показано, що в Хаджибейському лимані також переважали представники відділу *Proteobacteria*, в той час як в Сухому і Дністровському лиманах – представники відділу *Cyanobacteria*.

Метою даного дослідження було визначити біорізноманітність прокариотної мікробіоти в прибережній воді Одеської затоки Чорного моря шляхом метагеномного аналізу, що може дозволити з'ясувати основні тенденції у формуванні мікробних угруповань в залежності від території і супутніх умов, географічного розташування та антропогенного навантаження.

### Матеріали та методи

Пробу морської води з горизонту 100 см відбирали в Одеській затоці Чорного моря в районі Гідробіологічної станції Одеського національного університету імені І. І. Мечникова (координати 46°26'28.2"N 30°46'20.0"E), фільтрували через 0,22 μm мембранні фільтри (Sartorius) для збору мікроорганізмів. Сумарну ДНК зі зразка проби морської води виділяли з зібраних мікроорганізмів за допомогою Power Water DNA isolation kit (catalog no.14900-50-NF) згідно з інструкцією виробника (MO Bio Laboratories).

Дизайн праймерів відповідав протоколу Kozich et al [9]. В результаті секвенування, яке проводили на платформі Illumina MiSeq, було отримано 8276830 сирих рідів. Як адаптери використовували наступні послідовності: R1 – AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA і R2 – AGATCGGAAGAGCGTCTGTAGGGAAAGAGTGT.

Як праймери для регіону v4 16S рРНК використовували послідовності: F – GTGCCAGCMGCCGCGGTAA, R – GGACTACHVGG GTWTCTAAT.

ПЛР виконували з використанням наборів КАРА HiFi HotStart PCR kits



(Кара Biosystems). Кожна з сумішей складалася з 0,2 М Trehalose, 5  $\mu$ l Fidelity buffer, 0,75  $\mu$ l KAPA dNTP mix, 0,3  $\mu$ M прямого і зворотного праймера, 0,5 одиниць KAPA HiFi полімерази, близько 25ng матричної ДНК, і доводили суміш до 25 $\mu$ l дейонізованою водою. Умови для теплових циклів були: 95 °C – 3 хв., потім 27 циклів при 98 °C – 20 сек, 61 °C – 10 сек, і 72 °C – 15 сек. Фінальну елонгацію виконували 5 хв при 72 °C.

Продукти ПЛР очищали за допомогою набору AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter). Остаточну концентрацію отриманої бібліотеки амплікон 16S rDNA обчислювали з використанням набору KAPA Universal qPCR kit (Кара Biosystems) перед запуском секвенування. Демультплексування було вироблено автоматично програмою MiSeqReporter по завершенню секвенування.

Аналіз отриманих рідів здійснювали на комп'ютері Apple з операційною системою MacOSX 10.11 El Capitan та використанням оболонки miniconda3. Якість послідовності перевіряли за допомогою програми Fastqcv.0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Потім послідовно використовували програми Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>) і Cutadapt (<https://github.com/marcelm/cutadapt>) з метою виділити послідовності адаптерів, праймерів і високо повторюваних ділянок, після чого проводили повторний контроль їх якості.

Після процедури «очищення» послідовностей використовували асемблер SPAdes (<http://bioinf.spbau.ru/en/spades>). У роботі використовували модуль metaSPAdes. Таксономічне профілювання здійснюється за допомогою Centrifuge (<http://www.ccb.jhu.edu/software/centrifuge/index.shtml>).

Візуалізацію результатів проводили за допомогою інтерактивного візуалізатора Krona (<https://github.com/marbl/Krona/wiki>). Після проведення метагеномного асемблеру і таксономічного профілювання було отримано 261197 анотованих послідовностей.

### Результати та їх обговорення

У результаті проведеного аналізу води Одеської затоки Чорного моря в районі Гідробіологічної станції Одеського національного університету імені І. І. Мечникова виявлені представники відділів домену Bacteria: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes*, *Spirochaetia*, *Fusobacteria*, *Thermotogae*, *Deinococci*, *Aquificae*, *Chlorobia*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Deferribacteres*, *Planctomycetes*, *Chlamydiae*, *Acidobacteria*, *Nitrospirae*, *Ignavibacteriae*, *Thermodesulfobacteria*, *Dictyoglomia*, *Elusimicrobia*, *Synergistia*, *Fibrobacteria*, *Gemmatimonadetes* та домену Archaea: *Euryarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Crenarchaeota*, що свідчить про широкий спектр прокаріотних мікроорганізмів у досліджуваній пробі морської води.

Слід відмітити, що основні відділи домену Bacteria були ідентифіковані також за метагеномного аналізу 16S рРНК проб води з акваторії острова Зміїний [3] і проб з чорноморських лиманів південного заходу України [4], але різнилися у кількісному вмісті ідентифікованих послідовностей. Так, в морській воді акваторії острова Зміїний кількість ідентифікованих послідовностей, що



були віднесені до відділу *Firmicutes* склала лише 0,1% [4], а в морській воді з Одеської затоки в районі Гідробіологічної станції частка ідентифікованих послідовностей відділу *Firmicutes* склала 5,0% (табл. 1).

Таблиця 1

Кількісний розподіл представників домену *Bacteria* на рівні відділів

Table 1

Quantity distribution of *Bacteria* domain representatives at the phylum level

Відділ	N, %	Відділ	N, %
Proteobacteria	68,0	Verrucomicrobia	0,07
Bacteroidetes	19,0	Deferribacteres	0,06
Firmicutes	5,0	Planctomycetes	0,06
Actinobacteria	4,0	Chlamydiae	0,06
Суанобacteria	2,0	Acidobacteria	0,06
Tenericutes	0,6	Nitrospirae	0,05
Spirochaetia	0,4	Ignavibacteriae	0,05
Fusobacteriia	0,3	Thermodesulfobacteria	0,04
Thermotogae	0,1	Dictyoglomia	0,02
Deinococci	0,1	Elusimicrobia	0,01
Aquificae	0,09	Synergistia	0,01
Chlorobia	0,09	Fibrobacteria	0,008
Chloroflexi	0,08	Gemmatimonadetes	0,006

Найбільш поширений відділ *Proteobacteria* (68,0%) представлений класами  $\gamma$ -*Proteobacteria* (63,0%) і  $\alpha$ -*Proteobacteria* (31,0%). Кількість  $\beta$ -*Proteobacteria* склала 4,0% від усіх послідовностей, а  $\delta$ -*Proteobacteria* близько 2,0% (рис. 1). Аналогічну картину спостерігали, у воді Чорного моря біля острова Зміїний [4]. При дещо меншій загальній кількості представників відділу *Proteobacteria* (51,4%) найбільш представленими були  $\gamma$ -*Proteobacteria* і  $\alpha$ -*Proteobacteria*. За даними Costantino et al [6] в зразках води, зібраних з глибини 20-40 м члени групи  $\gamma$ -*Proteobacteria* були присутні на усіх глибинних ділянках і представляли собою панівний таксон.

Представники класу  $\beta$ -*Proteobacteria* представлені родинами *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae*, *Alcaligenaceae*, *Oxalobacteraceae* порядку *Burkholderiales*.

Серед бактерій класу  $\delta$ -*Proteobacteria* визначені порядки *Desulfovibrionales*, *Desulfobacterales* і *Desulfuromonadales*, тобто сульфатредуквальні бактерії, які, як показали Costantino et al, переважно зустрічалися на глибинах нижче хемоклину [6].

Серед представників класу  $\gamma$ -*Proteobacteria*, згідно отриманого нами таксономічному профілювання, ідентифіковані послідовності віднесені до порядків *Alteromonadales* (родини *Pseudomonadaceae* і *Alteromonadaceae*), *Pseudomonadales* (родини *Pseudomonadaceae* і *Moraxellaceae*), *Enterobacterales* (родини *Enterobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Erwiniaceae*) та *Vibrionales* (родина *Vibrionaceae*).



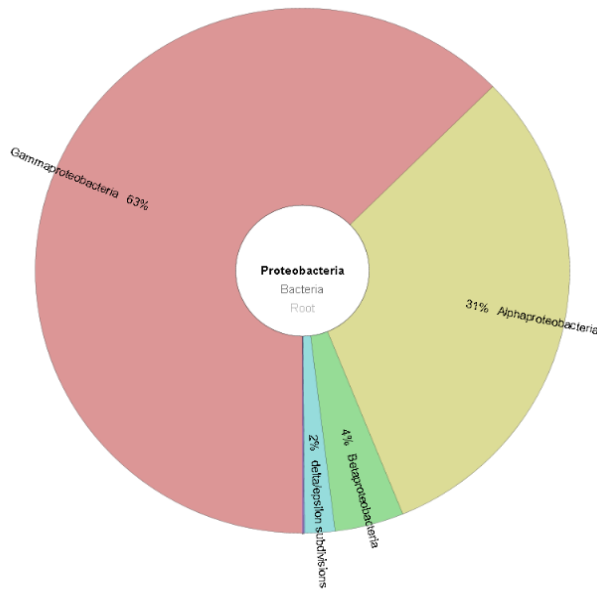


Рис. 1. Таксономічний склад бактерій відділу *Proteobacteria*

Fig. 1. Taxonomic composition of bacteria in *Proteobacteria* phylum

Другим за кількістю представленим відділом домену *Bacteria* є *Bacteroidetes* (19,0%). Ця таксономічна група включає неспороутворювальні грамнегативні анаеробні бактерії, які дуже поширені в морському середовищі і донних відкладеннях. Згідно отриманим нами даних, представники класу *Flavobacteria* були найбільш чисельними серед відділу *Bacteroidetes* (89,0%). Кількість ідентифікованих послідовностей, що віднесені до класів *Sphingobacteria*, *Cytophagia* та *Bacteroidia* була набагато меншою (рис. 2), що співпадає з результатами отриманими для води з акваторії острова Зміїний [4].

Бактерії відділу *Cyanobacteria*, що відомі як типові морські мешканці, складають лише 2,0% від усіх виявлених послідовностей. Найбільш поширеними серед них були члени класів *Synechococcales* (67,0% *Cyanobacteria*) і *Oscillatoriothycideae* (17,0%). Представники порядків *Nostocales*, *Gloeobacteria* та *Pleurocapsales* присутні у незначній кількості (рис. 3). При цьому, у воді акваторії острова Зміїний кількість представників *Cyanobacteria* досягали 11,1% від усіх виявлених послідовностей [4].

Чисельність представників відділу *Firmicutes* була набагато більша ніж в воді акваторії острова Зміїний [4] і складала 5,0%. Серед представників цього класу ідентифіковані послідовності, що відносяться до порядків *Bacillales* і *Lactobacillales*.

Порядок *Bacillales* представлений родинami *Bacillaceae*, *Staphylococcaceae*, *Paenibacillaceae*, *Listeriaceae*, *Planococcaceae*, *Alicyclobacillaceae* (рис. 4), порядок *Lactobacillales* – родинami *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Streptococcaceae* (рис. 5).

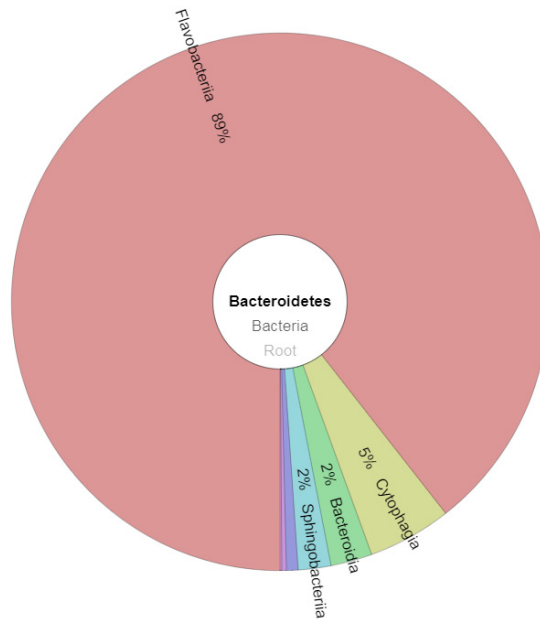


Рис. 2. Таксономічний склад бактерій відділу *Bacteroidetes*  
Fig. 2. Taxonomic composition of bacteria in *Bacteroidetes* phylum

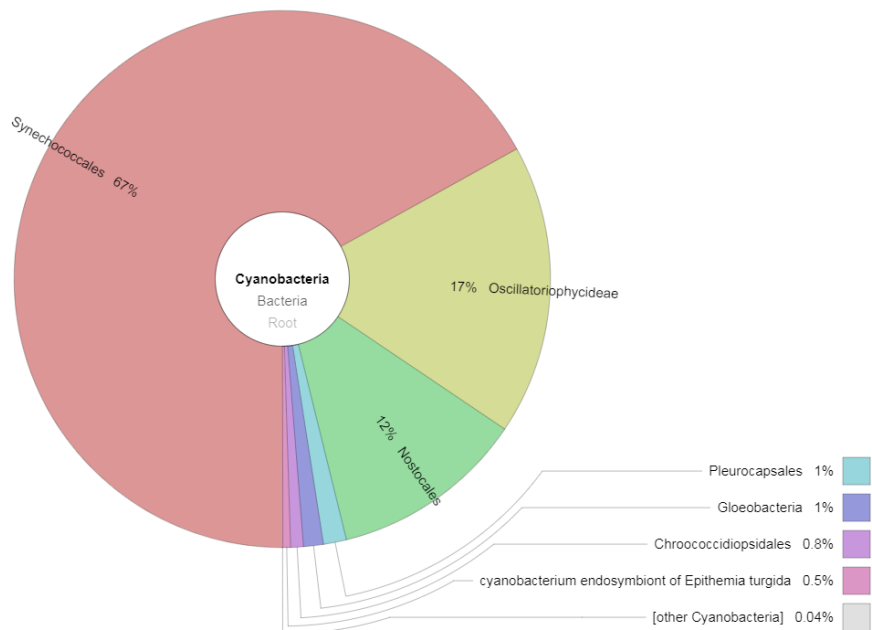


Рис. 3. Таксономічний склад бактерій відділу *Cyanobacteria*  
Fig. 3. Taxonomic composition of bacteria in *Cyanobacteria* phylum





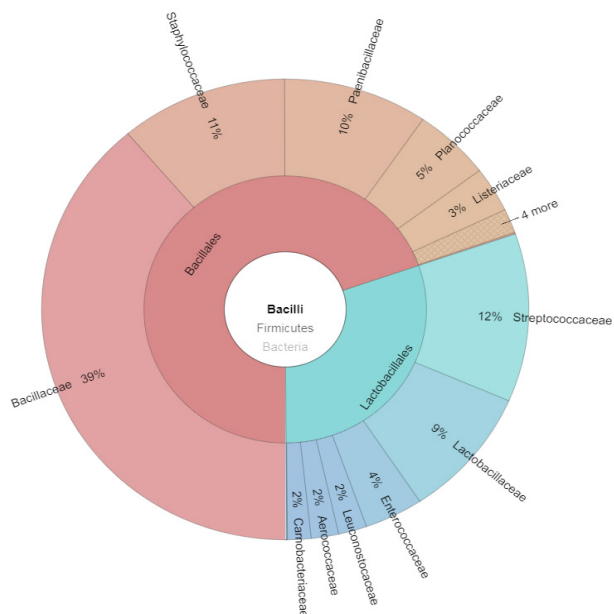


Рис. 4. Таксономічний склад бактерій порядку *Bacillales*

Fig. 4. Taxonomic composition of bacteria in the *Bacillales* order

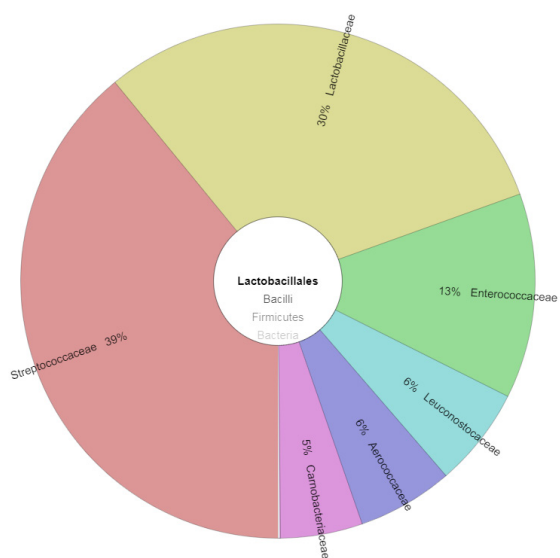


Рис. 5. Таксономічний склад бактерій порядку *Lactobacillales*

Fig. 5. Taxonomic composition of bacteria in the *Lactobacillales* order

Досить цікавим є визначення представників домену *Archaea* (відділи *Euryarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Crenarchaeota*) у прибережній воді (0,5%). *Thaumarchaeota* є хемолітотрофами, здатними окиснювати аміак, присутність якого часто відмічається у глибинних водах [2]. А *Euryarchaeota* у більшості залежить від кількості та якості органічних поживних ресурсів, що підтверджує їх гетеротрофний (або міксотрофний) тип метаболізму *Euryarchaeota* [10]. *Crenarchaeota* також відносяться до архей, та їх фізіолого-біохімічні властивості більш різноманітні: серед *Crenarchaeota* є ацидофіли і нейтрофіли, суворі і факультативні анаероби та суворі аероби, хемолітоавтотрофи і хемоорганотрофи. Вони можуть використовувати сірку у своєму метаболізмі [1].

Як видно з рисунку 7 таксономічна різноманітність прокаріотної спільноти води Хаджибейського лиману [3], акваторії острова Зміїний Чорного моря [4] та її прибережної частини Одеської затоки подібні між собою. Різниця для цих проб більш виражена у кількісному вимірі ніж у таксономічному і проявляється вже на рівні відділів.

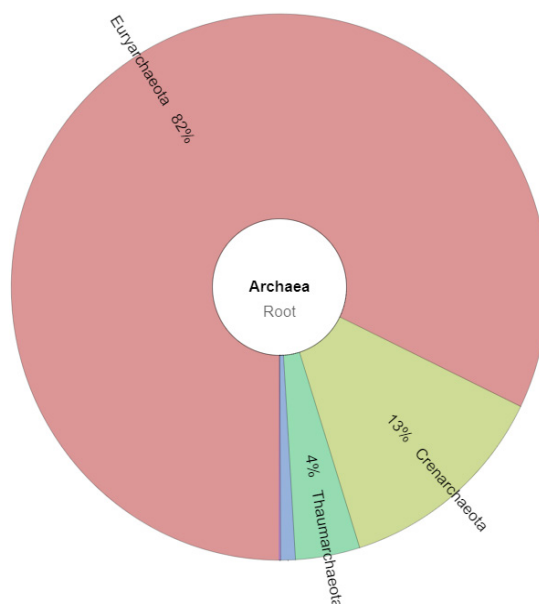


Рис. 6. Таксономічний склад відділів домену *Archaea*

Fig. 6. Taxonomic composition of the *Archaea* domain

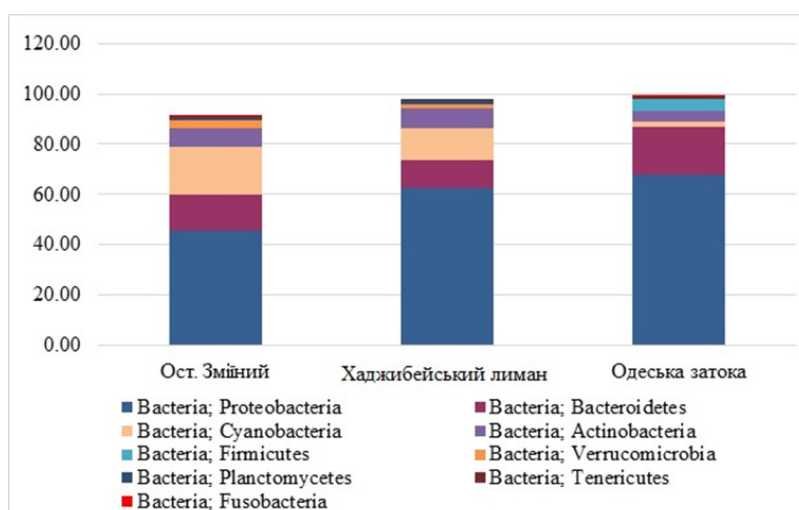


Рис. 7. Порівняльна характеристика біологічної різноманітності прокаріот води акваторій острова Зміїний, Хаджибейського лиману та Одеської затоки Чорного моря

Fig. 7. Comparative results of the metagenomic analysis of the open water area of the Black Sea (Zmeiny Island), Khadzhybei estuary and from the coastal seawater of the Black Sea (Biological station)

Отже, порівняльний аналіз результатів наведених у цій статті та отриманих у попередніх дослідженнях біологічної різноманітності морської мікробіоти води Причорноморських лиманів і прибережних вод острова Зміїний дозволили визначити основні відмінності у їх складі. Показано, що здебільшого мікробіота морської води Одеської затоки як і Хаджибейського лиману та прибережної води острова Зміїний різноманітна і представлена переважно членами відділів *Proteobacteria* і *Bacteroidetes*, в той час як у Сухому і Дністровському лиманах переважають представники відділу *Cyanobacteria* [3].

N. Yu. Vasyleva<sup>1</sup>, K. D. Krylova<sup>1</sup>, J. B. Kristoffersen<sup>2</sup>,  
O. A. Dubrovina<sup>1</sup>, V. O. Ivanytsia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., 65082, Odesa, Ukraine,  
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

<sup>2</sup> Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, Hellenic Centre for Marine  
Research, Gournes 71500, 71003 Heraklion, Greece

## MICROBIAL DIVERSITY OF COASTAL WATERS OF ODESA BAY OF THE BLACK SEA

The **aim** of the study was to determine the biodiversity of the prokaryotic microbiota of the coastal water of Odesa Bay of the Black Sea with the help of metagenomics analysis. **Methods.** Sample of sea water was taken in the area of Hydrobiological station of Odesa I. I. Mechnikov National University (46°26'28.2"N 30°46'20.0" E). Sample of sea water was taken from the horizon of 100 cm and filtered through



0.22  $\mu\text{m}$  membrane filters (Sartorius). Total DNA was isolated from the collected microorganisms using the PowerWater DNA isolation kit (catalog no.14900-50-NF) according to the manufacturer's instructions (MO BioLaboratories). Total DNA extraction has been performed according to the manufacturer's instructions (MO BioLaboratories) from collected microorganisms using the PowerWater DNA isolation kit (catalog no.14900-50-NF). To determine the microbial diversity with the help of metagenomic analysis, there were carried out targeted sequencing performed on the Illumina MiSeq platform after amplify v4 region of the 16S rRNA gene. The obtained sequences in the fastq format were analyzed in the miniconda3 shell with used next programs: Fastqcv.0.11.2., Trimmomatic, Cutadapter, SPAdes, Centrifuge and Krona. **Results.** As a result of the metagenomics 16S rRNA gene analysis of the coastal waters of Odesa Bay about 261 197 annotated sequences were defined. The representatives of main departments of the domain Bacteria were identified: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria, Tenericutes, Spirochaetia, Fusobacteria, Thermotogae, Deinococci, Aquificae, Chlorobia, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Deferribacteres, Planctomycetes, Chlamydia, Acidobacteria, Nitrospirae, Ignavibacteriae, Thermodesulfobacteria, Dictyoglomia, Elusimicrobia, Synergistia, Fibrobacteria, Gemmatimonadetes. The most common departments of Bacteria domain were Proteobacteria (68.0%) and Bacteroidetes (19.0%). The representatives of Gammaproteobacteria (63.0%) and Alphaproteobacteria (31.0%) were dominated among the Proteobacteria. The presence of small amount of representatives of the Archaea domain (less than 0.5%) as the classes Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Crenarchaeota was shown. **Conclusion.** A comparative analysis of the presented results and those that were obtained during previous studies of the biological diversity of microbial communities in the Black Sea estuaries and in the region of the Zmiinyi Island made it possible to determine the main differences in their composition. As it was shown, microbial communities of the coastal water of Odesa Bay, water of the Khadzhybei estuary and in the region of the Zmiinyi Island is manifold and is represented mainly by the members of Proteobacteria and Bacteroidetes while representatives from Cyanobacteria phylum is dominate in the Dry and Dniester estuaries.

**Key words:** Odesa Bay, the Black Sea, seawater, 16S rRNA gene-based metagenomic analysis, microbial biodiversity.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Воробьева Л. И. Археи: учебное пособие для вузов. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2007. — 447 с.
2. Berg C., Listmann L., Vandieken V., et al. Chemoautotrophic growth of ammonia-oxidizing Thaumarchaeota enriched from a pelagic redox gradient in the Baltic Sea// Front. Microbiol. — 2015. — Vol. 15, № 5. — Article 786. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00786>
3. Bobrova O, Kristoffersen JB, Oulas A, Ivanytsia V. Metagenomic 16s rRNA investigation of microbial communities in the Black Sea estuaries in South-West of Ukraine// Acta Biochim Pol. 2016;63(2):315-9. doi: 10.18388/abp.2015\_1145. Epub 2016 Feb 29.
4. Bobrova O. E., Kristoffersen J., Ivanytsia V. O. Metagenome 16S rRNA gene analysis of the Black Sea microbial diversity in the region of the Zmiinyi Island//



Microbiology & Biotechnology. – 2015. – Vol. 2. – P. 6–9. doi: 10.18524/2307-4663.2015.2(30).48066

5. *Collins C. P., Carlsson J., Rowcroft P., Tibbles B.* Ecosystem status of the deep Black Sea, soft sediment, benthic community//Marine Policy. – 2016. – Vol. 73. – P. 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2016.07.016>

6. *Costantino V., Hiep V. T., Lee J. K.* Fingerprinting Microbial Assemblages from the Oxic/Anoxic Chemocline of the Black Sea// Applied and environmental microbiology. – 2003. – Vol. 69, No. 11. – P. 6481–6488. doi: 10.1128/AEM.69.11.6481-6488.2003

7. *DeLong E. F, Preston C. M, Mincer T, Rich V, Hallam S. J, Frigaard N. U,* et al. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. Science. 2006; 311: 496–503. doi: 10.1126/science.1120250

8. *Jannasch HW.* Microbial processes in the Black Sea water column and top sediment: an overview// Black Sea oceanography. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. – 1991. – P. 271–286.

9. *Kozich J. J., Westcott S. L., Baxter N. T., Highlander S. K., Schloss P. D.* Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – V. 79, № 17. – P. 5112–5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13

10. *Lloyd K. G., Schreiber L., Petersen D. G.* et al., Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins // Nature. – 2013. – Vol. 496. – P. 215–218 doi:10.1038/nature12033

11. *Ludwig A. K., Henßge Uta, Glaeser J.* Subfossil 16S rRNA Gene Sequences of Green Sulfur Bacteria in the Black Sea and Their Implications for Past Photic Zone Anoxia // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – Vol. 74, No.3. – P. 624–632. doi:10.1128/AEM.02137-07

12. *Mirko Basen, Martin Krüger, Jana Milucka.* Bacterial enzymes for dissimilatory sulfate reduction in a marine microbial mat (Black Sea) mediating anaerobic oxidation of methane// Environmental Microbiology. – 2011. – Vol. 13, No. 5. – P. 1370–1379. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02443.x

13. *Michaelis W., Seifert R., Nauhaus K.* Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane//Science.–2002. – Vol. 297. – P. 1013–1015 doi: 10.1126/science.1072502

14. *Schauer R., Bienhold C., Ramette A, Harder J.* Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean// International Society for Microbial Ecology. – 2010. – Vol.4. – P. 159–170. doi:10.1038/ismej.2009.106

15. *Takao Iino, Koji Mori, Yoshihito Uchino,* et al., *Ignavibacterium album* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of Ignavibacteria classis nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria// International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2010. – Vol. 60. – P. 1376–1382 doi:10.1099/ijs.0.012484-0

16. *Thamdrup B., Rossello-Mora R., Amann R.* Microbial Manganese and Sulfate Reduction in Black Sea Shelf Sediments// Applied and environmental



microbiology. – 2000. – Vol. 66, No. 7. – P. 2888–2897.

17. *Todorova H. N., Mironova S. R., Karamfilov K. V.* Comparative molecular analysis of bacterial communities inhabiting pristine and polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons Black Sea coastal sediments// *Marine Pollution Bulletin.* – 2014. – Vol. 83. – P. 231–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.047>

### References

1. *Vorobeva LI.* Arhei: uchebnoe posobie dlya vuzov.2007. Moskva:IKTs «Akademkniga». 447. – (in Russian).

2. *Berg C, Listmann L, Vandieken V, et al.* Chemoautotrophic growth of ammonia-oxidizing Thaumarchaeota enriched from a pelagic redox gradient in the Baltic Sea. *Front. Microbiol.* 2015;15(5):article 786. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00786>

3. *Bobrova O, Kristoffersen JB, Oulas A, Ivanytsia V.* Metagenomic 16s rRNA investigation of microbial communities in the Black Sea estuaries in South-West of Ukraine. *Acta Biochim Pol.* 2016;63(2):315-319. doi: 10.18388/abp.2015\_1145. Epub 2016 Feb 29.

4. *Bobrova OE, Kristoffersen J, Ivanytsia VO.* Metagenome 16S rRNA gene analysis of the Black Sea microbial diversity in the region of the Zmiinyi Island. *Microbiology & Biotechnology.* 2015;(2):6-19. doi: 10.18524/2307-4663.2015.2(30).48066

5. *Collins CP, Carlsson J, Rowcroft P, Tibbles B.* Ecosystem status of the deep Black Sea, soft sediment, benthic community. *Marine Policy.* 2016;(73):216-223. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2016.07.016>

6. *Costantino V, Hiep VT, Lee JK.* Fingerprinting Microbial Assemblages from the Oxic/Anoxic Chemocline of the Black Sea. *Applied and environmental microbiology.* 2003;69(11):6481–6488. doi: 10.1128/AEM.69.11.6481-6488.2003

7. *DeLong EF, Preston CM, Mincer T, Rich V, Hallam SJ, Frigaard NU, et al.* Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science.* 2006;(311):496-503. doi: 10.1126/science.1120250

8. *Jannasch HW.* Microbial processes in the Black Sea water column and top sediment: an overview. *Black Sea oceanography.* 1991 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. – P. 271–286.

9. *Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD.* Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied and Environmental Microbiology.* 2013;(79):5112-5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13

10. *Lloyd KG, Schreiber L, Petersen DG, et al.,* Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature.* 2013;(496):215-218. doi:10.1038/nature12033

11. *Ludwig AK, Henßge Uta, Glaeser J.* Subfossil 16S rRNA Gene Sequences of Green Sulfur Bacteria in the Black Sea and Their Implications for Past Photic Zone Anoxia. *Applied and Environmental Microbiology.* 2008;74(3): 624-632. doi:10.1128/AEM.02137-07

12. *Mirko Basen, Martin Krüger, Jana Milucka.* Bacterial enzymes for





dissimilatory sulfate reduction in a marine microbial mat (Black Sea) mediating anaerobic oxidation of methane. *Environmental Microbiology*. 2011;13(5):1370–1379. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02443.x

13. *Michaelis W, Seifert R, Nauhaus K*. Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science*.2002;(297):1013-1015 doi: 10.1126/science.1072502

14. *Schauer R, Bienhold C, Ramette A, Harder J*. Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. *International Society for Microbial Ecology*. 2010;(4):159-170. doi:10.1038/ismej.2009.106

15. *Takao Iino, Koji Mori, Yoshihito Uchino, et al.*, *Ignavibacterium album* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of *Ignavibacteria* classis nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010;(60): 1376-1382. doi:10.1099/ijs.0.012484-0

16. *Thamdrup B, Rossello-Mora R, Amann R*. Microbial Manganese and Sulfate Reduction in Black Sea Shelf Sediments. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(7): 2888-2897.

17. *Todorova HN, Mironova SR, Karamfilov KV*. Comparative molecular analysis of bacterial communities inhabiting pristine and polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons Black Sea coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 2014;(83):231-240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.047>

Стаття надійшла до редакції 05.11.2018 р.



## ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

До статті додається 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 (українською/російською) та 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).
- Молекулярку масу (Мм) – Да (дальтони) або кДа.
- При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.
- Активність ферментів виражають в мкмолях 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 ммоль/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.

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

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



**Список використаної літератури**

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

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

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

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

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

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

Назви статей наводять англійською мовою.

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

**Зразки посилання літератури**

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

**На книги**

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

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

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

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

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

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

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

**На журнальні статті**

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

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



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

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

#### **На тези доповідей**

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

#### **На депоновані наукові роботи**

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

#### **На стандарти**

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

#### **На автореферати дисертацій**

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

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

##### **References**

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

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

##### **Статті в журналах:**

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

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

##### **Книги:**

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

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

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

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

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





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/](http://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 10.12.2018 р. Формат 70x100/16.  
Ум.-друк. арк. 6,58. Тираж 100 пр.  
Зам. № 1859.

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