

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал
Виходить 3 рази на рік з 2019 року
Засновано у липні 2006 року

№ 1(45)
2019

Одеса
ОНУ
2019

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

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

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

Науковий редактор випуску В. О. Іваниця

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

**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 (Націо-
нальна бібліотека України імені В. І. Вернадського), Ulrich's periodicals, Електронний
архів-репозитарій Одеського національного університету імені І. І. Мечникова, На-
укова 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, 2019

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

EDITOR-IN-CHIEF

V. O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T. O. Filipova (Odesa, Ukraine)

EXECUTIVE SECRETARY

T. V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

Scientific editor V. O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

**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 Ukraine (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, 2019

ЗМІСТ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

Н. В. Гора, С. В. Серга, О. М. Майстренко, І. А. Козерецька ДИНАМІКА ЧАСТОТ ГЕНОТИПІВ <i>WOLBACHIA</i> В ПРИРОДНІЙ ПОПУЛЯЦІЇ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> З УМАНИ ПРИ ВПЛИВІ КЛІМАТИЧНИХ ФАКТОРІВ	6
Н. В. Ліманська, О. В. Басюл, Т. В. Суворова, Г. В. Степанюк, В. О. Іваниця ЗДАТНІСТЬ <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ОНУ 12 ДО ВИЖИВАННЯ В УМОВАХ ҐРУНТУ	16
І. А. Блайда, Т. В. Васильєва, Л. І. Слюсаренко, Н. Ю. Васильєва СТІЙКІСТЬ ДО ВАЖКИХ МЕТАЛІВ АЦИДОФІЛЬНИХ ХЕМОЛІТОТРОФНИХ БАКТЕРІЙ, ЩО ВИДИЛЕНІ З ТЕХНОГЕННОЇ СИРОВИНИ	24
Т. В. Гудзенко, І. П. Конуп, О. В. Волювач, О. Г. Горшкова, Т. О. Беляєва, М. М. Чабан ВИЛУЧЕННЯ ФЕНОЛУ З ВОДИ БАКТЕРІЯМИ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ОНУ551, АДГЕЗОВАНИМИ НА НОСІЯХ РІЗНОЇ ПРИРОДИ	36
М. М. Чабан, Т. В. Гудзенко ВИЯВЛЕННЯ АНАМОКС БАКТЕРІЙ У СТІЧНИХ ВОДАХ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ВИРОБНИЦТВА	48
Н. Ю. Васильєва, Л. І. Слюсаренко, Т. В. Васильєва АКУМУЛЯЦІЯ $Cu(II)$ МОРСЬКИМИ НЕЙТРОФІЛЬНИМИ ТІОНОВИМИ БАКТЕРІЯМИ	56
АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2018 РОЦІ	69
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	74

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

N. V. Gora, S. V. Serga, O. M. Maistrenko, I. A. Kozeretska DYNAMICS OF FREQUENCIES OF <i>WOLBACHIA</i> GENOTYPES IN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> POPULATION FROM UMAN' UNDER INFLUENCE OF CLIMATE FACTORS	6
N. Limanska, O. Basiul, T. Suvorova, G. Stepaniuk, V. Ivanytsia SURVIVAL OF <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ONU 12 IN SOIL	16
I. Blayda, T. Vasylieva, L. Sliusarenko, N. Vasylieva RESISTANCE OF ACIDOPHILIC CHEMOLYTOTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM TECHNOGENIC RAW MATERIALS TO HEAVY METALS	24
T. V. Gudzenko, I. P. Konup, O. V. Voliuvach, O. G. Gorshkova, T. O. Belyaeva, M. M. Chaban REMOVAL OF PHENOL FROM WATER BY <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ONU551 BACTERIA, ADHESIZED ON THE CARRIERS OF DIFFERENT NATURE	36
M. M. Chaban, T. V. Gudzenko ANAMMOX BACTERIA DETERMINATION IN THE PHARMACEUTICAL PRODUCTION WASTEWATER	48
N. Yu. Vasylieva, L. I. Sliusarenko, T. V. Vasylieva CU (II) ACCUMULATION BY MARINE NEUTROPHIL SULFUR-OXIDIZING BACTERIA	56
ALPHABET INDEX OF PAPER PUBLISHED IN JOURNAL "MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY" IN 2018 YEAR	69
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	74

N. V. Gora¹, S. V. Serga¹, O. M. Maistrenko^{1,2}, I. A. Kozeretska¹

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv,
60, Volodymyrska str., Kyiv, 01601, Ukraine,

² European Molecular Biology Laboratory,
1, Meyerhofstrasse, Heidelberg, 69117, Germany
tel.:+38 (066) 853 02 11 e-mail: nazar_gora@knu.ua

DYNAMICS OF FREQUENCIES OF *WOLBACHIA* GENOTYPES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* POPULATION FROM UMAN' UNDER INFLUENCE OF CLIMATE FACTORS

Summary

Aim. To investigate the potential influence of climate parameters on the rate of *Wolbachia* genotypes frequencies in the population of *D. melanogaster* from Uman' for the last seven years. **Methods.** We have surveyed *Wolbachia* infection status for isofemale lines from Uman' collected during summer – fall 2013 and 2015-2017 using polymerase chain reaction (PCR) with primers specific to the 16S rRNA and *wsp* (*Wolbachia* surface protein) genes. To determine *wMel* and *wMelCS* genotypes of *Wolbachia*, we have conducted PCR using polymorphic markers for the presence of the insertion sequence *IS5* in *WD1310* locus and the copy number of minisatellite repeats in *VNTR-141* locus. Infection status of flies for 2011, 2012 and 2014 years was included from our previous studies. Data of climate factors (average seasonal temperature, dew point, and precipitation) for winter and summer of each year were obtained from weather database. Statistical analysis of *Wolbachia* genotypes-climate factors interaction was carried out in *R* version 3.5.0 using multiple linear model regression. **Results.** We have observed the decline of *Wolbachia* presence in Uman' locality and prevalence of *wMel* bacteria variant. Moreover, our study documented the low persistence of rare *wMelCS* genotype through seven years in Uman'. *wMelCS* frequency has been driven by the combined influence of the average temperature and humidity in summer ($p = 0.03662$, $R^2 = 0.9995$). **Conclusions.** The climate variability affects frequency of *wMelCS* genotype of *Wolbachia* in the *D. melanogaster* natural population from Uman'.

Key words: *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, *wMelCS*, endosymbiont, climate factors, Uman', Ukraine.

Introduction

Endosymbiont *Wolbachia* is maternally inherited bacteria that are carried by a variety of terrestrial arthropods altering their reproduction throughout reproductive parasitism. The most frequent deleterious effect observed in a large fraction of host species is cytoplasmic incompatibility (CI) [27]. Despite negative impact, bacteria can also provide fitness advantages for the host such as viral resistance



[21], nutrient supply [2], higher fecundity [20] and adaptation under environmental stress [17].

The endosymbiont-host association can be influenced by climate changes such as fluctuation in temperature, humidity, precipitation, and weather phenomena. It was shown that presence of the endosymbionts such as *Curculioniphilus*, *Sodalis*, *Serratia*, *Wolbachia*, *Rickettsia*, and *Spiroplasma* in chestnut weevils is modulated with ecological factors [23]. *Wolbachia* has persistent clinal distribution among the natural population of *Drosophila melanogaster* in Australia [13]. It has been studied that *Wolbachia* is vulnerable to exposure to the higher temperature. Therefore, the higher temperature can reduce bacteria's negative impacts on hosts [10]. Frequency of bacteria is reduced under cold conditions and is rapidly increased after diapause in the parasitic wasp [18]. Hence, the environmental impact can modulate titers of endosymbiont and affect the selection pressure within the bacteria-host association. Recently, it has been shown that *Wolbachia* frequency correlates with longitude, altitude, and annual mean temperature in mites [26]. On the contrary, for ladybirds, hot climate does not affect the distribution of *Wolbachia* and their effects on the host [3].

Wolbachia has high distribution among *Drosophila*-group species, despite the weak cytoplasmic incompatibility in *wMel* strain in *D. melanogaster* [8], *wAu* in *D. simulans* [9], *wSuz* in *D. suzukii* [7] and neutral strain in *D. mauritiana* [5]. Low CI and inconsistent weak fitness effects cannot explain high frequencies of *Wolbachia* in host populations. Understanding of geographic variation in infection rates and its causes within species is also still limited. The fitness cost of host-*Wolbachia* interactions may vary due to abiotic factors and genetic backgrounds of host and symbionts.

Wolbachia is highly widespread in natural populations of *Drosophila melanogaster*. It is known that endosymbiont does not instigate any severe effects on a reproductive system of *D. melanogaster* and can provide fitness advantage for the host [4]. There are a few strains that infect *D. melanogaster* in nature, *wMel* is predominant among them. Nowadays, *wMelCS* is rare in nature [15]. Also, there is evidence of clinal variation of the spread of *wMel* genotype in Australia, indicating that abundance of it declines from high to low latitudes [13]. Nevertheless, European populations have stable infection frequencies of *Wolbachia* from year to year [20] and, as it was shown previously, there is no clinal distribution of infection, at least in Eastern Europe [11]. Another aspect that should be considered, is that the European population of *D. melanogaster* was established much earlier than those ones in North America and Australia, about 10000–15000 years ago [13]. Thus, reproductive dormancy of flies from Europe during the winter period may differ reproductive dormancy from temperate climate of the rest world. There are studies that indicate that *Wolbachia*-infected flies prefer cooler conditions. Furthermore, *wMel* infected flies, contrary to *wMelCS* infected, have a preference to warmer conditions, similar to which that uninfected flies prefer [1, 23]. Hence, we conclude that absence of clinal distribution of bacteria in European populations of *D. melanogaster* might be linked with other geographic factors such as local oscillation of climate in the area.

Uman' has a moderate continental climate with mild winters and warm



summers. Also, *wMelCS* strain has been detected in the 80s in this locality. We have collected the data on infection dynamics for Uman' population of *D. melanogaster* and climate factors for past 7 years. Our aim was to analyze the environmental effects on frequencies of *Wolbachia* genotypes in nature, particularly for infection in Uman' population of *D. melanogaster*.

Materials and methods

We collected *D. melanogaster* at the fruit orchards near local juice factory in Uman' (48°45'45.26"N 30°14'38.97"E) where *wMelCS* variant was detected in the 80s [11]. Flies were collected each fall (September–October) during 2013 and 2015–2017 years using active capture by an insect net and bait that contained apple pomace. The established isofemale lines [12] were used for further analysis. The flies were reared at 25 ± 1 and 70–80% relative humidity, were fed on a standard semolina-agar diet with yeast granules (6 g agar, 15 g yeast granules, 50 g sugar, 55 g semolina, 1 L of water). Propionic acid was used as an antifungal agent (4 mL propionic acid per 1 L medium).

Whole-bodies of 10–12 adult flies of each isofemale line were used for isolation of total genomic DNA by the salting-out method. To define *Wolbachia* infection-status, we surveyed the samples by PCR method using the set of primers to bacterial 16S rRNA [16] and *wsp* genes [25]. The genotypes of *Wolbachia* were determined via PCR using polymorphic markers for the presence of the insertion sequence IS5 in WD1310 locus (IS5 is presented in *wMelCS*) and the copy number of minisatellite repeats in VNTR-141 locus (6 and 7 copies in *wMelCS* and *wMel*, respectively) [19]. PCR amplicons were visualized on 2% agarose gel.

Flies go through dormancy stage during winter and suffer consequent bottleneck effect. Population reaches its maximum size in summer. Therefore, we chose the climate parameters of winter (January and February only were included as winter months of the particular year) and summer season as potential factors that influence infection dynamics of both *wMel* and *wMelCS* strains. Climate data were obtained from www.wunderground.com and www.geographic.org (table 1). For the statistical analysis of data, multiple linear model regression was applied. Average seasonal temperature (TA), humidity (dew point – DA), precipitation (PA) were used as independent variables and infection level was used as dependent variable. ANOVA was used to detect significant factors affecting genotype frequencies. The normality and stability of variables were assessed using appropriate statistical tests (Studentized Breush-Pagan, Durbin-Watson test). For infection rates, Clopper-Pearson's confidence interval method was applied. All statistical analyses were carried out in R version 3.5.0 using *lmttest* package [22].

Results

We analyzed 210 isofemale lines from Uman'. Our results (data for 2013, 2015–2017 yr.) in combination with data from Serga et al. [20] (for 2011–2012 yr.) and Gora et al. [6] (for 2014 yr.) of *Wolbachia* screening (fig. 1) indicate the tendency for decrease of infection rate for past 7 years in Uman' (fig. 2) and an explicit prevalence of the genotype *wMel* over *wMelCS*.



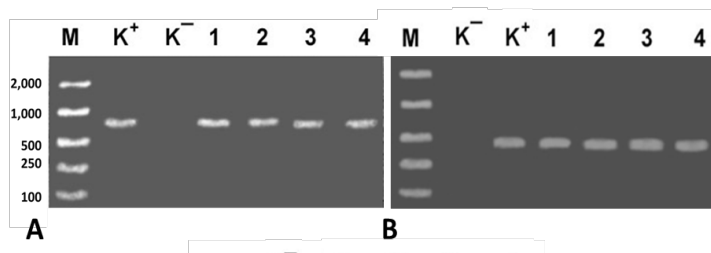


Fig. 1. Electrophoregrams of infection detection (A, B):

M – 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; K⁺ – positive control from total DNA of Canton-S strain; K⁻ – negative control showing no infection; 1–4 – amplicons of infected isofemale lines; A – *wsp* gene (size of band – 632 bp); B – *16S* RNA (438 bp)

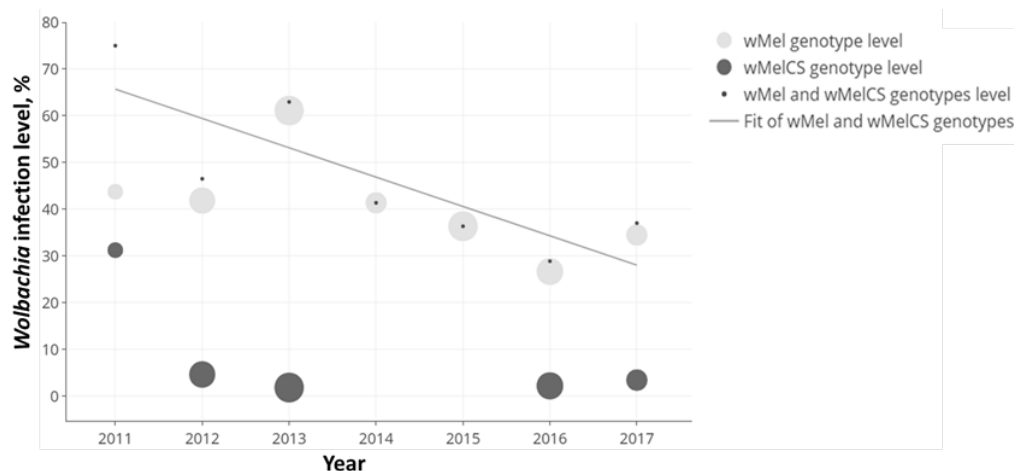


Fig. 2. Infection frequencies of natural population of *D. melanogaster* from Uman'
(Size of circles is proportional to $\log(N)$, where N = sample size)

Based on obtained data (table 1), we have performed general multiple linear model for average values of each climate parameters: $wMel/wMelCS \sim TA + DA + PA + TA \times DA + DA \times PA$. Other models that have maximum, minimum and mixed variables of climate parameters are not shown because of the insignificance of each one (p-values varied from 0.06 to 0.7).

The model of *wMelCS* for summer season was significant ($F(5,1) = 429.4$, $p = 0.03662$, $R^2 = 0.9995$) (Model I). ANOVA for this model showed that PA ($F = 1673.711$, $df = 1$, $p = 0.016$) and $TA \times DA$ ($F = 207.582$, $df = 1$, $p = 0.044$) has significant influence on *wMelCS* frequencies. The same model for winter season showed insignificant result ($p = 0.5498$) as well as model of *wMel* genotype with parameters of both summer ($p = 0.3169$) and winter ($p = 0.9989$) (Model II). The details of the models presented in the Table 2.

Table 1

The average values of climate factors and infection rates of two examined *Wolbachia* genotypes from Uman' for 7 years of study

Year	Sample size, n	wMel, %	wMelCS, %	Temperature, °C		Dew point, °C		Precipitation, cm	
				S	W	S	W	S	W
2011 ¹	16	44 (20 – 70) ³	31(11 – 59) ²	20	-4	14	-7	2	0.4
2012 ¹	43	42 (27 – 58) ³	5 (0.6 – 16) ²	21	-6	13	-10	1	3.2
2013	54	61 (47 – 74) ³	2 (0.05 – 10) ²	19	-2	14	-4	1	0.8
2014 ²	29	41 (24 – 61) ³	0	19	-3	13	-6	1	0.4
2015	55	36 (24 – 50) ³	0	20	-1	13	-4	1	0.5
2016	45	27 (15 – 42) ³	2 (0.06 – 12) ²	20	-2	14	-4	1	1.05
2017	27	34 (17 – 54) ³	3 (0.09 – 19) ²	20	-4	13	-7	1	0.45

¹from Serga et al. [20] and ²Gora et al. [6]; ³Clopper-Pearson's confidence interval; S – summer, W – winter, n – number of isofemale lines

Table 2

Outcome of multiple linear regression models based on relationship between wMel/wMelCS yearly levels and climate variables (Significant values are marked by bold font)

Model	Variables	Summer				Winter			
		Estimates	SE	t-value	p-value	Estimates	SE	t-value	p-value
I	Intercept	5073.525	364.665	13.91	0.0457	-148.2706	141.2795	-1.049	0.485
	TA	-240.660	18.301	-13.15	0.0483	43.5631	24.8664	1.752	0.330
	DA	-380.560	27.045	-14.07	0.0452	-47.1674	43.2375	-1.091	0.472
	PA	-333.543	31.434	-10.61	0.0598	98.7794	56.1602	1.759	0.329
	TA × DA	18.019	1.356	13.29	0.0478	0.6592	6.1077	0.108	0.932
	DA × PA	26.279	2.309	11.38	0.0558	13.3595	6.9676	1.917	0.306
II	Intercept	-11551.01	3065.34	-3.768	0.165	83.148	372.250	0.223	0.860
	TA	599.30	153.84	3.896	0.160	-18.484	65.519	-0.282	0.825
	DA	868.28	227.34	3.819	0.163	12.786	113.924	0.112	0.929
	PA	-465.38	264.23	-1.761	0.329	-46.270	147.974	-0.313	0.807
	TA × DA	-44.86	11.40	-3.935	0.158	-1.078	16.093	-0.067	0.957
	DA × PA	34.06	19.41	1.755	0.330	-6.014	18.359	-0.328	0.798

I, II – models of wMelCS and wMel, respectively; SE – standard error

The Model I for summer indicates that average temperature and dew point variables have possible influence on wMelCS dynamics. For further validation of this model we developed the prediction model based on Model I and compared expected wMelCS levels with observed one. Based on estimates from table 2, we obtained the following equation: predicted level of wMelCS = - 240.660 × TA -



$380.560 \times DA - 333.543 \times PA + 18.019 \times TA \times DA + 26.279 \times DA \times PA + 5073.525$.
The predicted ones *wMelCS* levels were plotted against observed ones those in this study (fig. 3).

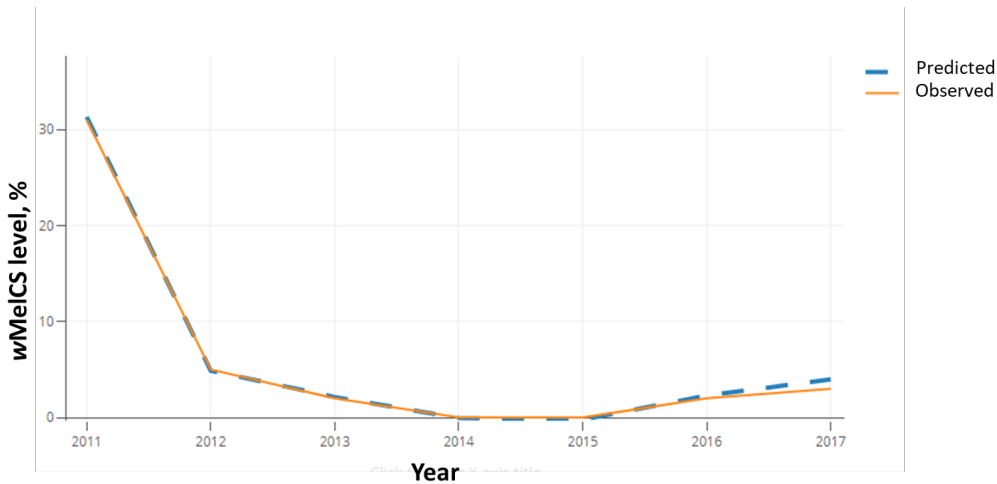


Fig. 3. Correlation of observed and predicted levels of *wMelCS* genotype for 2011–2017

Predicted and field data have significant correlation between each other (Pearson correlation coefficient: $r = 0.9997$, $p < 0.001$).

Discussion

Stable co-existence of two genotypes of *Wolbachia* is unique quality of *D. melanogaster* population in Uman' locality. Besides, it has recorded here since mid-20th century. We suggest that one of the causes of continuous *wMelCS* presence in this population can be that the infected flies might be re-established after winter in the local refugia such as a juice factory in this town. This hypothesis is also supported by the fact that Serga et al. [20] surveyed two other population from Uman' and they were infected only with *wMel* genotype.

Our results indicate that the dynamics of *wMelCS* have been affected by climate factors during the years of monitoring. This can be attributed to the changes of climate in the northern hemisphere as well as in Ukraine. During 112 years the average temperature has increased on 0.8–1 °C in the region where Uman' is located. The more intensive increase of temperature was observed for the last ten years (on 0.3 °C) in Ukraine, indicating the warming process [13].

Our results indicate that the infection rate has propensity to decline over the last decade in *D. melanogaster* population in Uman'. Truit et al [24] have shown that infected flies prefer a lower range of temperature than uninfected ones. This behavioral adaptation is likely affecting the accuracy of the estimation of the link between temperature and infection frequencies. Thus, such a relationship has to be observed over the influence of narrow interval of temperature during the season.

Conclusions

Relying on previous experimental evidence and our observations we



speculate that *wMelCS* frequencies are affected by climate factors *D. melanogaster* population from Uman'. Nevertheless, the relationships between environmental factors and infection dynamics need to be investigated in the combination of both field and laboratory studies.

Acknowledgment

We thanks to Pavlo Kovalenko, a student of Taras Shevchenko National University of Kyiv, for his help in collecting flies from Uman'.

Н. В. Гора¹, С. В. Серга¹, О. М. Майстренко^{1,2},
І. А. Козерецька¹

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 60, Київ, 01601, Україна

² European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse,
1, Heidelberg, 69117, Germany
тел.: +38 (066) 853 02 11 e-mail: nazar_gora@knu.ua

ДИНАМІКА ЧАСТОТ ГЕНОТИПІВ *WOLBACHIA* В ПРИРОДНІЙ ПОПУЛЯЦІЇ *DROSOPHILA* *MELANOGASTER* З УМАНІ ПРИ ВПЛИВІ КЛІМАТИЧНИХ ФАКТОРІВ

Реферат

Мета. Визначити можливий вплив кліматичних параметрів на частоту генотипів *Wolbachia* в популяції *Drosophila melanogaster* Умані протягом семи років. **Методи.** Для визначення рівня інфікованості *Wolbachia* в ізосамкових лініях, збір яких здійснювався впродовж літньо-осіннього періоду 2013 р. та 2015–2017 рр. з Умані, було проведено полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) зі специфічними праймерами до генів 16S rRNA та *wsp* (*Wolbachia surface protein*) бактерії. Для визначення *wMel* та *wMelCS* генотипів *Wolbachia* було проведено ПЛР з маркерами наявності IS5 інсерції в локусі *WD1310* та зміни кількості мінісателітних повторів у *VNTR-141* локусі. Результати статусу інфекції мух за 2011–2012 рр. та 2014 р. були включені з наших попередніх робіт. Дані кліматичних факторів (середня температура, точка роси та кількість опадів за сезон) для зими та літа кожного року дослідження були отримані з погодних баз даних. Статистичний аналіз взаємодії генотипів *Wolbachia* та кліматичних факторів було проведено в R v.3.5.0, використовуючи множинний регресійний аналіз. **Результати.** Виявлено зниження частоти інфікованості *Wolbachia* та переважання *wMel* генотипу в природній популяції *Drosophila melanogaster* Умані протягом років моніторингу. Також було встановлено низькі частоти рідкісного в природних умовах *wMelCS* генотипу. Частота *wMelCS* була зумовлена сумісним впливом середньої температури та вологості влітку ($p = 0.03662$, $R^2 = 0.9995$). **Висновки.** Кліматична мінливість впливає на генотип *wMelCS* бактерії *Wolbachia* у природній популяції *D. melanogaster* з Умані.

Ключові слова: *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, *wMelCS*, дрозофіла, ендосимбіонт, кліматичні фактори, Умань, Україна.



Н. В. Гора¹, С. В. Серга¹, О. М. Майстренко^{1,2},
І. А. Козерецька¹

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ул. Владимирская, 60, Київ, 01601, Україна

² European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse,
1, Heidelberg, 69117, Germany

тел.: +38 (066) 853 02 11 e-mail: nazar_gora@knu.ua

ДИНАМИКА ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ *WOLBACHIA* В ПРИРОДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ *DROSOPHILA* *MELANOGASTER* ИЗ УМАНИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИЮ КЛИМАТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Реферат

Цель. Определить возможное влияние климатических параметров на частоту генотипов *Wolbachia* в популяции *Drosophila melanogaster* Умани в течение семи лет. **Методы.** Для определения уровня инфицированности *Wolbachia* в изосамочных линиях, сбор которых осуществлялся в течение летне-осеннего периода 2013 г. та 2015–2017 гг. из Умани, была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) со специфическими праймерами к генам 16S rRNA и wsp (*Wolbachia* surface protein) бактерии. Для определения wMel и wMelCS генотипов *Wolbachia* было проведено ПЦР с маркерами наличия IS5 инсерции в локусе WD1310 и изменения количества минисателлитных повторов в VNTR-141 локусе. Результаты статуса инфекции мух за 2011–2012 гг. и 2014 г. были включены из наших предыдущих работ. Данные климатических факторов (средняя температура, точка росы и количество осадков за сезон) для зимы и лета каждый год исследования были получены из погодных баз данных. Статистический анализ взаимодействия генотипов *Wolbachia* и климатических факторов было проведено в R v.3.5.0, используя множественный регрессионный анализ. **Результаты.** Выявлено снижение частоты инфицированности *Wolbachia* и доминирование wMel генотипа в природной популяции *D. melanogaster* Умани в течение семи лет мониторинга. Также было установлено низкие частоты редкого в естественных условиях wMelCS генотипа. Частота wMelCS была обусловлена совместным влиянием средней температуры и влажности летом ($p = 0.03662$, $R^2 = 0.9995$). **Выводы.** Климатическая изменчивость влияет на генотип wMelCS бактерии *Wolbachia* в природной популяции *D. Melanogaster* из Умани.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, wMelCS, дрозофила, эндосимбионт, климатические факторы, Умань, Украина.

References

1. Arnold PA, Levin S, Stevanovic AL, Johnson K. *Wolbachia*-infected *Drosophila* prefer cooler temperatures. *Ecological Entomology*. 2018;44(1): eea.12696.
2. Brownlie JC, Cass BN, Riegler M, Witsenburg JJ, Iturbe-Ormaetxe I, McGraw EA, O'Neill SL. Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathog*. 2009; 5(4): e1000368.



3. Elnagdy S, Messing S, Majerus MEN. Two strains of male-killing *Wolbachia* in a ladybird, *Coccinella undecimpunctata*, from a hot climate. PLoS One. 2013; 8(1): e54218.
4. Fry AJ, Palmer MR, Rand DM. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. Heredity (Edinb). 2004; 93(4): 379–389.
5. Giordano R, Oneill SL, Robertson HM. *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana*. Genetics. 1995; 140: 1307–1317.
6. Gora NV, Kostenko ND, Maistrenko OM, Serga SV, Kozeretsk IA. The lack of correlation between the level of radioactive contamination and infection with *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila melanogaster* from Ukraine. The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series «Biology». 2016; 26: 60-64. (in Ukrainian)
7. Hamm CA, Begun DJ, Vo A, Smith CC, Saelao P, Shaver AO, Turelli M. *Wolbachia* do not live by reproductive manipulation alone: infection polymorphism in *Drosophila suzukii* and *D. subpulchrella*. Mol. Ecol. 2014; 23(19): 4871–4885.
8. Hoffmann AA. Partial cytoplasmic incompatibility between two Australian populations of *Drosophila melanogaster*. Entomol. Exp. Appl. 1988; 48(1): 61–67.
9. Hoffmann AA, Clancy D, Duncan J. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. Heredity (Edinb). 1996; 76(1): 1–8.
10. Hurst GD, Johnson AP, Schulenburg JHG, Fuyama Y. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. Genetics. 2000; 156.2: 699–709.
11. Ilinsky YY, Zakharov IK. The endosymbiont *Wolbachia* in Eurasian populations of *Drosophila melanogaster*. Russ. J. Genet. 2007. 43(7): 748–756.
12. Inoue Y, Watanabe TK. Chromosomal polymorphism in isofemale lines and cage populations of *Drosophila melanogaster*. Evolution. 1992; 46(3): 797–806.
13. Kriesner P, Conner WR, Weeks AR, Turelli M, Hoffmann AA. Persistence of a *Wolbachia* infection frequency cline in *Drosophila melanogaster* and the possible role of reproductive dormancy. Evolution (N. Y). 2016; 70(5): 979–997.
14. Kulbida MI., Ielistratova LO, Barabash MB. Current climate conditions in Ukraine. Problems of environmental protection and ecological safety. 2013; 35: 118–130. (in Ukrainian)
15. Nunes MDS, Nolte V, Schlo C. Nonrandom *Wolbachia* infection status of *Drosophila melanogaster* strains with different mtDNA haplotypes. Molecular biology and evolution. 2008; 25(11): 2493-2498.
16. O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1992; 89(7): 2699–702.
17. Olsen K, Reynolds KT, Hoffmann AA. A field cage test of the effects of the endosymbiont *Wolbachia* on *Drosophila melanogaster*. Heredity (Edinb). 2001; 86(6): 731–737.
18. Perrot-Minnot MJ, Guo LR, Werren JH. Single and double infections with *Wolbachia* in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: effect on compatibility.



Genetics. 1996; 143: 961–972.

19. Riegler M, Sidhu M, Miller WJ, O’Neill SL. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 2005; 15(15): 1428–1433.

20. Serga S, Maistrenko O, Rozhok A, Mousseau T, Kozeretska I. Fecundity as one of possible factors contributing to the dominance of the wMel genotype of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Symbiosis.* 2014; 63(1): 11–17.

21. Stevanovic AL, Arnold PA, Johnson KN. *Wolbachia*-mediated antiviral protection in *Drosophila* larvae and adults following oral infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015: AEM.02841-15.

22. Team R. C. R: A language and environment for statistical computing. 2018.

23. Toju H, Fukatsu T. Diversity and infection prevalence of endosymbionts in natural populations of the chestnut weevil: relevance of local climate and host plants. *Mol. Ecol.* 2011; 20(4): 853–868.

24. Truitt AM, Kapun M, Kaur R, Miller WJ. *Wolbachia* modifies thermal preference in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Microbiol.* 2018; 00(00): 00–00.

25. Zhou W, Rousset F, O’Neill S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences.* 1998; 265(1395): 509-515.

26. Zhu YX, Song YL, Zhang YK, Hoffmann AA, Zhou JC, Sun JT, Hong XY. Incidence of facultative bacterial endosymbionts in spider mites associated with local environments and host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018; 84(6): e02546-17.

27. Zug R, Hammerstein P. *Wolbachia* and the insect immune system: what reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of *Wolbachia*–host interactions. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 1–16

Стаття надійшла до редакції 09.01.2019 р.



УДК 579.64:632.4

**Н. В. Ліманська, О. В. Басюл, Т. В. Суворова,
Г. В. Степанюк, В. О. Іваниця**

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

ЗДАТНІСТЬ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ОНУ 12 ДО ВИЖИВАННЯ В УМОВАХ ҐРУНТУ

Мета роботи: встановити тривалість збереження життєздатності бактерій *Lactobacillus plantarum* ОНУ 12 в умовах ґрунту. **Матеріали і методи.** Культуру бактерій *L. plantarum* ОНУ 12 КУО/мл вносили у чорноземний і торф'яний ґрунти у двох варіантах – без рослин та з тест-рослинами *Kalanchoe daigremontiana* Mill до досягнення концентрації 108 КУО/г. Через кожні чотири дні здійснювали контроль чисельності лактобацил шляхом висіву мікробіоти ґрунту на агаризоване середовище MRS та вивчення фенотипових ознак і подальшої ідентифікації методом полімеразної ланцюгової реакції. **Результати.** Лактобацили найдовше зберігали життєдіяльність у ризосфері рослин, які культивували у чорноземному ґрунті: на 44-й день експерименту їх чисельність становила $(2,8 \pm 0,4) \times 10^2$ КУО/г, у ґрунті без рослин зберігалися щонайменше 36 діб. У торф'яному ґрунті лактобацили виживали у найменший термін і не виявлялися після 32-ї доби, а у ризосфері рослин у торф'яному ґрунті – щонайменше 36 діб. **Висновок.** В залежності від ґрунту та присутності рослин лактобацили здатні зберігати життєздатність до 44 діб.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, ґрунт, ризосфера, збереження життєздатності.

Перші відомості про успішне застосування лактобацил з метою покращення росту рослин були описані у 1980-х роках [9], але дотепер у науковій літературі зустрічається невелика кількість публікацій з цієї тематики [2; 3; 8; 10]. Наші дослідження, проведені впродовж останніх років, показали високий потенціал застосування молочнокислих бактерій у стимуляції росту рослин [11; 12]. Можливою причиною, через яку лактобацили не застосовуються широко в органічному землеробстві, є те, що ці мікроорганізми вимагають для росту багатих живильних середовищ. Через це терміни їх виживання у ґрунті та на поверхнях рослин залишаються дискусійними. Наші дослідження показали, що бактерії *Lactobacillus plantarum* можуть виживати на поверхнях тест-рослин (томати, каланхое, виноград) щонайменше протягом одного місяця [1], але залишилася не вивченою тривалість виживання їх у ґрунті. Noda et al. (2011) вказували на виживання лактобацил у польових умовах протягом двох місяців [10].

Метою роботи було встановити тривалість збереження життєздатності

© Н. В. Ліманська, О. В. Басюл, Т. В. Суворова, Г. В. Степанюк, В. О. Іваниця, 2019



бактерій *Lactobacillus plantarum* ОНУ 12 в умовах ґрунту.

Матеріали і методи дослідження

Для штучної інокуляції ґрунту використовували штам *L. plantarum* ОНУ 12 з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова. Наведений штам, за нашими попередніми дослідженнями, проявляє виражену фітостимульовальну активність [12].

Бактерії вирощували у рідкому середовищі MRS [5] протягом 24–30 год при 37 °С до досягнення концентрації 10⁹ КУО/мл.

Для штучної інокуляції використовували два типи ґрунтів: південний важко суглинковий малогумусний чорнозем, відібраний на польовій ділянці Одеської області, і придбаний комерційний ґрунт (Поліський, «Універсальний») з високим вмістом торфу. Перед дослідженнями ґрунти перевіряли на наявність лактобацил, для чого здійснювали посіви розведень ґрунту на середовище MRS. Молочнокислі бактерії у даному ґрунті виявлені не були.

У ґрунт вносили культуру лактобацил з концентрацією 10⁹ КУО/мл. Концентрацію бактерій вимірювали за допомогою спектрофотометра Biorad BioRadSmartSpec, США згідно з інструкцією виробника приладу (https://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/Spectrophotometer_BioRad_SmartSpecPlus_UserManual.pdf). У 80 г ґрунту вносили 30 мл культури до досягнення концентрації лактобацил 10⁸ КУО/г та перемішували для повного зволоження ґрунту. Використовували два варіанти експерименту: в одному варіанті досліджували тривалість виживання у чорноземному і торф'яному ґрунтах без рослин, у другому варіанті досліджували терміни виживання у ризосфері молодих (3 місяці) тест-рослин каланхое *Kalanchoe daigremontiana* Mill.

Після внесення лактобацил інокульований ґрунт залишали у теплиці за температури 20–22 °С і 12 год освітлення. Проводили чотири незалежних експерименти з 5 повторами у кожному. Через кожні чотири доби 1 г відібраного ґрунту змішували з 10 мл стерильної дистильованої води і готували ряд серійних розведень. З кожного розведення здійснювали висів методом газону на середовище MRS. Лактобацили попередньо ідентифікували за морфологією колоній (дрібні, округлі, молочного кольору) та біохімічними властивостями (здатність до закислення рідкого середовища MRS). Для цього переносили біомасу з колоній, які нагадували колонії молочнокислих бактерій, у бульйон MRS, культивували 48 год і вимірювали рН культуральної рідини. Бактерії також забарвлювали за Грамом та проводили мікроскопування (x1540). З грам-позитивними паличками, зібраними у ланцюжки, такими, що закислюють середовище, проводили каталазну реакцію з використанням 2% перекису водню. Приналежність бактерій до роду *Lactobacillus* підтверджували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ДНК бактерій виділяли за допомогою тест-набору «ДНК-сорб» (АмпліСенс, Росія). Готували реакційні суміші наступного складу: 200 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів у суміші, 10x ПЛР буфер, що постачається з ферментом, 2 Од Таq-полімерази, 2,0 мМ MgSO₄ (АмпліСенс, Росія), 0,2 мМ кожного з праймерів та 2 мкл ДНК. Усі реактиви – фірми Fermentas (Литва).

Використовували праймери planFi pREV до видоспецифічних послідов-



ностей *L. plantarum* згідно з Torgiani et al. (2001) [14]. Розмір ампліконів – 318 п.н. [14]. Параметри ампліфікації: початкова денатурація 94 °С, 3 хв; 30 циклів денатурації при 94 °С, 1 хв, відпалювання праймерів – температура 56 °С – 1 хв, елонгації – 72 °С, 30 сек; заключна елонгація – 72 °С протягом 5 хв.

Електрофорез для аналізу продуктів ПЛР проводили у 1,5% агарозі, застосовуючи трисборатний буфер. Використовували маркери молекулярної маси 110, 147, 190, 242, 331, 404, 489, 501 п.о. (Fermentas, Литва). Фотографування гелів проводили за допомогою відеосистеми “GelDoc” (BioRad, США).

Середні значення та довірчий інтервал вираховували за допомогою пакету прикладних програм Excell.

Результати дослідження та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що тривалість виживання лактобацил у ґрунті відрізнялася в залежності від типу ґрунту і наявності тест-рослин (Табл.).

Таблиця

Кількість лактобацил у ґрунті (КУО/г) після штучної інокуляції

Table

Amount of lactobacilli in soil (CFU/ml) after experimental inoculation

Доба	Чорнозем		Торф'яний ґрунт	
	ґрунт	ризосфера	ґрунт	ризосфера
1	$(4,2 \pm 0,4) \times 10^8$	$(2,8 \pm 0,8) \times 10^8$	$(3,8 \pm 0,5) \times 10^8$	$(3,5 \pm 0,2) \times 10^8$
4	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^6$	$(4,5 \pm 0,6) \times 10^6$	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^5$	$(3,3 \pm 0,4) \times 10^6$
8	$(1,7 \pm 0,3) \times 10^5$	$(8,9 \pm 0,5) \times 10^5$	$(8,4 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^5$
12	$(7,1 \pm 0,5) \times 10^4$	$(4,2 \pm 0,3) \times 10^5$	$(5,2 \pm 0,3) \times 10^3$	$(8,3 \pm 0,4) \times 10^4$
16	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^5$	$(4,5 \pm 0,6) \times 10^3$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^4$
20	$(2,4 \pm 0,8) \times 10^3$	$(5,3 \pm 0,4) \times 10^4$	$(4,0 \pm 0,3) \times 10^3$	$(7,8 \pm 0,3) \times 10^3$
24	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^3$	$(3,1 \pm 0,2) \times 10^4$	$(3,2 \pm 0,7) \times 10^3$	$(5,6 \pm 0,4) \times 10^3$
28	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^3$	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^3$	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^3$	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^3$
32	$(6,1 \pm 0,4) \times 10^2$	$(7,3 \pm 0,2) \times 10^3$	$(6,5 \pm 0,5) \times 10^2$	$(7,1 \pm 0,3) \times 10^2$
36	$(4,3 \pm 0,3) \times 10^2$	$(4,5 \pm 0,6) \times 10^3$	0	$(1,4 \pm 0,5) \times 10^2$
40	0	$(3,3 \pm 0,3) \times 10^2$	0	0
44	0	$(2,8 \pm 0,4) \times 10^2$	0	0
48	0	0	0	0

Результати ідентифікації лактобацил за морфологічними і біохімічними властивостями було підтверджено методом ПЛР (Рис.).

Вже на четверту добу після інокуляції спостерігалася різниця у кількості життєздатних лактобацил у чорноземі, ризосфері у торф'яному ґрунті і торфі без рослин: в останньому випадку зменшення чисельності лактобацил було більш значним – на три порядки, з $(3,8 \pm 0,5) \times 10^8$ до $(2,3 \pm 0,2) \times 10^5$ КУО/мл (Табл.).



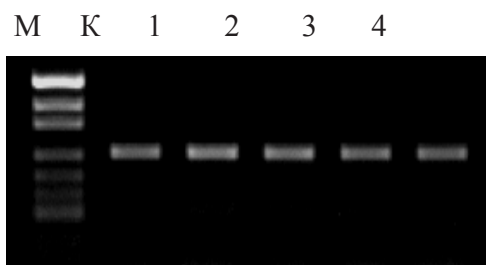


Рис. Зразок електрофореграми продуктів ПЛР з праймерами *planF* і *pREV* до видоспецифічних послідовностей *L. plantarum*:

М – маркери молекулярної маси, К – контроль (амплікони, отримані з ДНК штаму *L. plantarum* ОНУ 12), 1–4 – амплікони, отримані з ДНК молочнокислих бактерій, виділених з ґрунту на четверту добу дослідження

Fig. Example of an electrophoregram of products of PCR to species-specific sequences of *L. plantarum*:

М – markers of molecular weight, К – control (amplicons obtained from DNA of *L. plantarum* ONU 12 strain), 1–4 – amplicons obtained from DNA of lactic acid bacteria isolated from soil on the 4th day of experiment

Загалом, з 1-ї по 4-у добу спостерігалось найбільш різке зменшення чисельності бактерій інокулята – на 2–3 порядки. До 16-ї доби кількість лактобацил поступово зменшувалася. Встановлено, що вони краще зберігали життєздатність у ризосфері каланхое, які росли у чорноземному ґрунті. На 16-у добу чисельність лактобацил у ризосфері тест-рослин складала $(1,2 \pm 0,5) \times 10^5$ КУО/мл порівняно з чорноземом, в якому рослини не культивувалися, – $(1,3 \pm 0,2) \times 10^4$ КУО/мл. У торф'яному ґрунті чисельність лактобацил була найменшою – $(4,5 \pm 0,6) \times 10^3$ КУО/мл.

Така ж тенденція спостерігалася і надалі: у торф'яному ґрунті лактобацили виживали найменший термін і переставали виявлятися на 36-у добу. На 40-у добу лактобацили не висівалися з ризосфери каланхое, висадженого у торф'яний ґрунт, а найдовше досліджувані бактерії зберігали життєздатність у ризосфері тест-рослин у чорноземному ґрунті. Після 44-ї доби лактобацили вже не виділялися з ґрунту.

Отже, при внесенні у ґрунт початкової кількості 1×10^9 КУО/г *L. plantarum* ОНУ 12 після 1,5 місяця досліджень бактерії зберігали життєздатність у кількості $(2,8 \pm 0,4) \times 10^2$ КУО/г у чорноземному ґрунті ризосфери рослин. Надалі лактобацили не виділялися, що може свідчити як про їх загибель, так і про перехід у некультивований стан, що здається більш ймовірним з огляду на несприятливі умови ґрунту для бактерій даної групи. Чорноземний ґрунт виявився більш сприятливим для лактобацил, ніж торф'яний.

Дослідження Hoda et al (2011) показали, що лактобацили були здатними виживати у ґрунті з томатами протягом двох місяців [10]. У наших умовах досліді вивчали динаміку зміни чисельності лактобацил у закритій системі – ємностях з ґрунтом у теплиці. В інших літературних джерелах відомості про тривалість виживання лактобацил відсутні. Відомості про молочнокислих бактерій як мешканців ґрунту наводяться у публікаціях з огляду на їх виділення з ґрунту, здебільшого – з ризосфери. Також слід відзначити, що

подібні дослідження проводяться у географічних регіонах з субтропічним або тропічним кліматом, де вологий і теплий ґрунт робить виживання молочнокислих бактерій більш вірогідним. Так, Yanagida et al. [15; 16], Chen et al [4] виділяли молочнокислі бактерії з ґрунту в Японії, а Ekundayo [6], Fhoula et al [7], Oueyiola et al [13] – з ризосфери африканських рослин.

Отже, показано, що залежно від ґрунту та присутності рослин, досліджувані лактобацили здатні зберігати життєздатність до 44 діб.

N. Limanska, O. Basiul, T. Suvorova, G. Stepaniuk, V. Ivanytsia

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

SURVIVAL OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU 12 IN SOIL

Summary

Aim. To reveal the terms of survival of bacteria *Lactobacillus plantarum* ONU 12 in soil. **Materials and Methods.** Bacterial culture of the strain *L. plantarum* ONU 12 was added to chernozem and peat soil in two variants – without plants and with plants *Kalanchoedaigremontiana* Mill to reach the concentration 1×10^8 CFU/g. Every four days the amount of lactobacilli was evaluated by inoculation on agarized MRS medium, and by study of phenotypic characteristics and further identification by polymerase chain reaction. **Results.** Lactobacilli survived for the longest period in plant rhizosphere in humus: on the 44th day of experiment their amount was $(2.8 \pm 0.4) \times 10^3$ CFU/g, and in humus without plants they survived at least for 36 days. In peat soil with outplants lactobacilli survived for the shortest period, and they could not be isolated after 32th day. In rhizosphere of plants in peat soil they survived at least for 36 days. **Conclusion.** Depending on soil type and presence of plants, lactobacilli are able to survive up to 44 days.

Key words: lactic acid bacteria, soil, rhizosphere, survival.

**Н. В. Лиманская, Е. В. Басюл, Т. В. Суворова,
А. В. Степанюк, В. А. Иваныця**

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

СПОСОБНОСТЬ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ОНУ 12 К ВЫЖИВАНИЮ В УСЛОВИЯХ ПОЧВЫ

Реферат

Цель работы: установить сроки сохранения жизнеспособности бактерий *L. plantarum* ОНУ 12 в условиях почвы. **Материалы и методы.** Культуру бактерий штамма *L. plantarum* ОНУ 12 вносили в черноземную и торфяную почву в двух вариантах – без растений и с тест-растениями *Kalanchoe daigremontiana* Mill до достижения концентрации 1×10^9 КОЕ/г.



Через каждые четыре дня проводили контроль численности лактобацилл путем высева микробиоты почвы на агаризованную среду MRS и изучения фенотипических признаков и дальнейшей идентификации методом полимеразной цепной реакции. **Результаты.** Лактобациллы дольше всего сохраняли жизнеспособность в ризосфере растений, культивируемых в черноземной почве: на 44-й день эксперимента их численность составляла $(2,8 \pm 0,4) \times 10^2$ КОЕ/г, а в черноземе без растений бактерии выжили по меньшей мере 36 дней. В торфяной почве без присутствия растений лактобациллы выжили наименьшее время и перестали выявляться после 32-го дня, а в ризосфере растений в торфяной почве выжили по крайней мере в течение 36 суток. **Вывод.** В зависимости от типа почвы и присутствия растений лактобациллы способны сохранять жизнеспособность до 44 дней.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, почва, ризосфера, сохранение жизнеспособности.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Коротаєва Н. В., Ліманська Н. В., Басюл О. В., Сергєєва Ж. Ю., Іваниця В. О. Вживання лактобацил і агробактерій, інтродукованих у філосферу рослин // Біологічні студії. – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 23–30.
2. Ржевская В. С., Теплицкая Л. М., Отурина И. П. Колонизация ризопланы корней огурцов микроорганизмами, входящими в состав микробного препарата «Эмбико» // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина. – 2013. – № 4(2). – С. 63–70.
3. Baffoni L., Accorsi M., Gaggia F., Bosi S., Marotti I., Biavati B., Gioia D. D., Dinelli G. Inoculation with “Effective Microorganisms” of *Lolium perenne* L.: evaluation of plant growth parameters and endophytic colonization of roots // Environ Eng Manag J. – 2012. – Vol. 11(S144): <https://pdfs.semanticscholar.org/81dd/5b69abad3187c14c63a15ddf50a74add53c4.pdf>
4. Chen Y. S., Yanagida F., Shinohara T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure // Lett Appl Microbiol. – 2005. – Vol. 40(3). – P. 195–200.
5. DeMan J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J Appl Bacteriol – 1960 – № 23. – P. 130–135.
6. Ekundayo F. O. Isolation and identification of lactic acid bacteria from rhizosphere soil of three fruit trees, fish and ogi // Int J Curr Microbiol Appl Sci. – 2014. – Vol. 3. – P. 991–998.
7. Fhoula I., Najjari A., Turki Y., Jaballah S., Boudabous A., Ouzan H. Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia // Biomed Research International. – 2013. doi: 10.1155/2013/405708
8. 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.
9. Higa T., Kinjo S. Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation. In: Proceedings of 1st Intern Conf on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, Thailand. – 1989. – P. 13–16.



10. Hoda A. H., Yomna A. M., Shadia M. A.-A. In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant // Life Science J. – 2011. – Vol. 8. – P. 462–468.
11. Limanska N., Ivanytsia T., Basiul O., Krylova K., Biscola V., Chobert J. M., Haertlé T. Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings // Actaphysiologiae plantarum. – 2013. – No. 35, Vol. 5. – P. 1587–1595.
12. 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.
13. Oyeyiola G. P., Arekemase M. O., Sule I. O., Agbabiaka T. O. Rhizosphere bacterial flora of Okro (*Hibiscus esculentus*) // SciInt (Lahore). – 2013. – Vol. 25(2). – P. 273–276.
14. Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers // Appl Environm Microbiol. – 2001. – Vol. 67(8). – P. 3450–3454.
15. Yanagida F., Chen Y. S., Shinohara T. Searching for bacteriocin-producing lactic acid bacteria in soil // J Gen Appl Microbiol. – 2006. – Vol. 52(1). – P. 21–28.
16. Yanagida F., Srionnual S., Chen Y. S. Isolation and characteristics of lactic acid bacteria from Koshu vineyards in Japan // Lett Appl Microbiol. – 2008. – Vol. 47(2). – P. 134–139.

References

1. Korotaieva NV, Limanska NV, Basiul OV, SergeevaZh, Ivanytsia VO. The survival of lactobacilli and agrobacteria introduced into plant phyllosphere. Biologichni studii. 2015. 9(2): 23 – 30(in Ukrainian).
2. Rzhavskaia VS, Teplytskaia LM, Oturna YP. Colonization of cucumber root rhizoplane with microorganisms from microbial preparation «Embiko». Visnyk Dnipropetrovskoho universytetu. Biologhiia. Medytsyna. 2013. 4(2): 63–70 (in Russian).
3. Baffoni L, Accorsi M, Gaggia F, Bosi S, Marotti I, Biavati B, Gioia DD, Dinelli G. Inoculation with “Effective Microorganisms” of *Lolium perenne* L.: evaluation of plant growth parameters and endophytic colonization of roots. Environ Eng Manag J. 2012; 11(S144): <https://pdfs.semanticscholar.org/81dd/5b69abad3187c14c63a15ddf50a74add53c4.pdf>
4. Chen YS, Yanagida F, Shinohara T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. Lett Appl Microbiol. 2005. 40(3): 195–200.
5. DeMan JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. J Appl Bacteriol. 1960. 23: 130–135.
6. Ekundayo FO. Isolation and identification of lactic acid bacteria from rhizosphere soil of three fruit trees, fish and ogi. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2014. 3: 991–998.
7. Fhoula I, Najjari A, Turki Y, Jaballah S, Boudabous A, Ouzan H. Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. Biomed Research International. 2013: doi: 10.1155/2013/405708



8. 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.

9. Higa T, Kinjo S. Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation. In: Proceedings of 1st Intern Conf on Kyusei Nature Farming, KhonKaen, Thailand. 1989: 13–16.

10. Hoda AH, Yomna AM, Shadia MA-A. *In vivo* efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant. Life Science J. 2011. 8: 462–468.

11. Limanska N, Ivanytsia T, Basiul O, Krylova K, Biscola V, Chobert JM, Haertlé T. Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings. Actaphysiologiae plantarum. 2013. 35(5): 1587–1595.

12. 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.

13. Oyeyiola GP, Arekemase MO, Sule I, Agbabiaka T.O. Rhizosphere bacterial flora of Okro (*Hibiscus esculentus*). SciInt (Lahore). 2013. 25(2): 273–276.

14. Torriani S, Felis GE, Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. Appl Environm Microbiol. 2001. 67(8): 3450–3454.

15. Yanagida F, Chen YS, Shinohara T. Searching for bacteriocin-producing lactic acid bacteria in soil. J Gen Appl Microbiol. 2006. 52(1): 21–28.

16. Yanagida F, Srionnu S, Chen YS. Isolation and characteristics of lactic acid bacteria from Koshu vineyards in Japan. Lett Appl Microbiol. 2008. 47(2): 134–139.

Стаття надійшла до редакції 22.01.2019 р.



УДК 579.6:546.3

**И. А. Блайда, Т. В. Васильева, Л. И. Слюсаренко,
Н. Ю. Васильева**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина
e-mail: iblayda@ukr.net

УСТОЙЧИВОСТЬ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТЕХНОГЕННОГО СЫРЬЯ

Цель. Определение устойчивости к ионам тяжелых металлов ацидофильных хемолитотрофных бактерий, изолированных из отвальных пород топливно-энергетического комплекса Украины. **Методы.** Бактерии культивировали на агаризованной среде Сильвермана-Лундгрема 9К в присутствии ионов меди, цинка, никеля, кобальта и кадмия в диапазоне концентраций 0,5–12,0 г/дм³ с интервалом 0,5 г/дм³, в присутствии ионов свинца в диапазоне 0,25–1,50 г/дм³ с интервалом 0,05 г/дм³. Мезофильные бактерии культивировали при 35,0±0,2 °С, умеренно термофильные – при 50,0±0,2 °С в течение семи суток. Учет результатов осуществляли визуально. **Результаты.** Полученные результаты свидетельствуют о высоком уровне резистентности изолированных штаммов бактерий родов *Acidithiobacillus* и *Sulfobacillus* к различным ионам тяжелых металлов. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) металлов для изученных штаммов в несколько раз превышали их содержание в отвальных породах топливно-энергетического комплекса. Установлен ряд токсичности ионов металлов по отношению к выделенным бактериям: наиболее токсичным оказался Pb^{2+} (МИК для всех штаммов находилась в диапазоне 0,35–0,70 г/дм³), наименее токсичным – Cu^{2+} (МИК достигала 11,5 г/дм³). Определен ряд устойчивости изолированных штаммов ацидофильных хемолитотрофных бактерий родов *Acidithiobacillus* и *Sulfobacillus* по отношению к ионам токсичных металлов. Максимальной устойчивостью обладали штаммы, изолированные из отходов обогащения углей, минимальной – штаммы, изолированные из отходов сжигания углей. **Выводы.** Выделенные из техногенного сырья ацидофильные хемолитотрофные бактерии относятся к полирезистентным, так как они проявили высокий уровень устойчивости к широкому кругу ионов тяжелых металлов в широком диапазоне концентраций. Резистентность штаммов зависит от их индивидуальных особенностей и источников выделения. Выявлены межвидовые и внутривидовые различия штаммов по их резистентности, что может быть связано с различными факторами физиологического и генетического характера.

Ключевые слова: ацидофильные хемолитотрофные бактерии, резистентность, ионы тяжелых металлов.



Тяжелые металлы являются важной составляющей частью породы земной коры, постоянно присутствуют в биосфере, трансформируются, не подвергаются деградации, мигрируют по трофическим цепям и имеют тенденцию к накоплению в живых организмах. Металлы поступают в окружающую среду естественным путем как результат геохимических и природных процессов, так и антропогенным в результате деятельности предприятий добывающей и перерабатывающей промышленности, транспорта и др. [1, 2, 5]. Контроль за содержанием токсичных элементов в окружающей среде регламентируется понятием «предельно-допустимая концентрация» (ПДК), однако повсеместно, особенно в зонах активной промышленной деятельности, их содержание превышает значения ПДК в десятки и сотни раз. В высоких концентрациях металлы вызывают изменения в природных микробиоценозах, приводя к обеднению их состава и возникновению устойчивых форм. Влияние металлов на микроорганизмы зависит от многих факторов – вида микроорганизма, формы нахождения и концентрации металлов, физико-химических факторов окружающей среды [2, 12, 14]. Устойчивость к тяжелым металлам является важным физиологическим свойством, особенно когда речь идет об использовании микроорганизмов для переработки техногенного полиметаллического сырья.

В настоящее время имеется достаточно обширный материал, касающийся устойчивости к металлам различных групп микроорганизмов, в первую очередь *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*, *Rhodotorula glutinis*. Отечественными исследователями обнаружены устойчивые к металлам штаммы гетеротрофных микроорганизмов как в природных, так и в техногенных экологических нишах. В частности, получены результаты по выделению резистентных штаммов и микробных сообществ из стабильных природных экологических ниш – глин карстовых полостей украинского Подолья и Кавказа, а также природных ниш с экстремальными физико-химическими условиями – почв и фитоценозов Антарктики [3, 4].

Данные о резистентности ацидофильных хемолитотрофных бактерий (АХБ) немногочисленны и касаются в основном штаммов, изолированных из природных источников [11, 13, 17]. В то же время АХБ, входящие в состав сформированного микробного ценоза в техногенном сырье с повышенными концентрациями тяжелых металлов, ожидаемо должны быть высокорезистентными. Однако данные об этом в литературе ограничены.

Целью работы было определение устойчивости к ионам тяжелых металлов ацидофильных хемолитотрофных бактерий, изолированных из микробиоценоза отвальных продуктов топливно-энергетического комплекса (ТЭК) Украины.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили с ацидофильными хемолитотрофными мезофильными и умеренно термофильными штаммами (табл. 1), выделенными из микробиоценоза отвальных продуктов ТЭК Украины: породных отвалов углеобогащения центральной обогатительной фабрики (ЦОФ) «Червоноградская» Львовско-Волынского угольного бассейна (ЛВУБ) различного срока накопления (24–28 месяцев – черного цвета и хранящиеся более 60 месяцев



– красного), золошлаков и золы уноса после сжигания угля соответственно на Добротворской и Ладыженской теплоэлектростанциях (ТЭС). Свойства штаммов описаны в предыдущей работе [10].

Таблица 1

Штаммы ацидофильных хемолитотрофных бактерий, выделенных из отвальных продуктов ТЭК

Table 1

Strains of acidophilic chemolithotrophic bacteria isolated from dumps by fuel-energy complex

Штамм	Источник выделения
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lv red 9	Красная порода ЦОФ «Червоноградская»
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lv black 37	Черная порода ЦОФ «Червоноградская»
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DTV 1	Золошлак Добротворской ТЭС
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lad 5	Зола уноса Ладыжинской ТЭС
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lad 27	Зола уноса Ладыжинской ТЭС
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	Бурый уголь из шахт США
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> Lv red 11	Красная порода ЦОФ «Червоноградская»
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> Lv black 6	Черная порода ЦОФ «Червоноградская»
<i>Sulfobacillus</i> sp. Lad 29	Зола уноса Ладыжинской ТЭС

Соответствующие исследования проводились также с коллекционным штаммом *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 из Американской коллекции типовых культур, выделенным из бурого угля шахт США. Все штаммы хранятся в музее кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии Одесского национального университета имени И. И. Мечникова.

Выделенные штаммы можно отнести к экстремофилам, т.к. они получены из техногенных субстратов, микробиоценоз которых формируется в нестабильных физико-химических и климатических условиях, с высокими концентрациями тяжелых металлов (табл. 2).

Таблица 2

Концентрации тяжелых металлов в отвальных продуктах ТЭК

Table 2

Concentrations of heavy metals ions in dumps by fuel-energy complex

Отвальный продукт	Концентрация металла, г/т					
	Cu	Zn	Pb	Cd	Ni	Co
Золошлак Добротворской ТЭС	102,3±0,1	212,9±0,1	70,88±0,05	8,98±0,05	111,4±0,1	180,0±0,1
Зола уноса Ладыжинской ТЭС	68,30±0,05	276,7±0,1	108,7±0,1	7,20±0,05	230,8±0,1	305,0±0,1
Черная порода ЦОФ	62,18±0,05	112,5±0,1	42,20±0,05	2,82±0,05	134,2±0,1	116,1±0,1
Красная порода ЦОФ	78,90±0,05	130,8±0,1	57,92±0,05	3,63±0,05	132,9±0,1	188,8±0,1



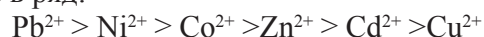
Все выделенные от отходов ТЭК штаммы изучали на устойчивость к ионам меди, цинка, никеля, кобальта и кадмия в диапазоне концентраций 0,5–12,0 г/дм³ с интервалом 0,5 г/дм³; к ионам свинца в диапазоне 0,25–1,50 г/дм³ с интервалом 0,05 г/дм³. Выбор этих металлов обусловлен их высокой токсичностью и сочетанием всех известных механизмов подавления жизнедеятельности микроорганизмов [2, 6].

Резистентность штаммов определяли при их культивировании на стандартной среде Сильвермана-Лундгрема 9К состава, г/дм³: K₂HPO₄ – 0,50; (NH₄)₂SO₄ – 3,00; MgSO₄×7H₂O – 0,50; KCl – 0,10; Ca(NO₃)₂ – 0,01. В качестве источников энергии использовали для *A. ferrooxidans* и *Sulfobacillus sp.* соль FeSO₄×7H₂O в концентрации 44,5 г/дм³; при культивировании *A. thiooxidans* – Na₂S₂O₃ в концентрации 5,0 г/дм³. Соли металлов в форме сульфатов растворяли в дистиллированной воде, стерилизовали на кипящей водяной бане в течение 10 мин и вносили в расплавленную агаризованную среду. Контролем служила среда 9К без металлов. Мезофильные штаммы культивировали при 35,0±0,2 °С, умеренно термофильные – при 50,0±0,2 °С в течение семи суток. Учет результатов осуществляли визуально, сравнивая рост штаммов в опытных и контрольных вариантах. Все опыты проводили в трёх повторностях. Минимально ингибирующей считали концентрацию (МИК, г/дм³), при которой еще сохраняется жизнеспособность исследуемого штамма, но полностью отсутствует его рост. Количественный анализ твердых субстратов осуществляли на атомно-эмиссионном спектрометре ЭМАС-200 ССД (Беларусь). Концентрацию металлов в растворах определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии на приборах ААС-1 (Германия) и С-115ПК Selmi (Украина). Микрофотосъемку проводили с помощью светового микроскопа Primo Star PC (Германия). Достоверность полученных результатов оценивали по критерию Стьюдента с вероятностью P<0,05.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследований обобщены в табл. 3 и свидетельствуют о высокой устойчивости выделенных штаммов к широкому спектру ионов тяжелых металлов. Наиболее показательные визуальные проявления резистентности бактерий представлены на рис. 1–4.

Как показали результаты исследований, наиболее токсичным для всех выделенных и изученных штаммов является ион свинца, его МИК составляет 0,35–0,70 г/дм³. На рис. 2 виден слабый рост по штриху выделенных бактерий *A. ferrooxidans* в присутствии 0,70 г/дм³ Pb²⁺ по сравнению с контролем (рис. 1). Минимальной токсичностью обладает ион меди: его МИК находится в диапазоне 2,5–11,5 г/дм³, в зависимости от штамма. В общем виде все исследованные ионы тяжелых металлов в порядке убывания их токсичного воздействия на выделенные бактерии родов *Acidithiobacillus* и *Sulfobacillus* можно расположить в ряд:



Максимальную устойчивость ко всем изученным ионам металлов проявляли *Acidithiobacillus ferrooxidans* Lv red 9 и *Acidithiobacillus ferrooxidans* Lv black 37, изолированные из отвалов обогащения углей. МИК всех метал-



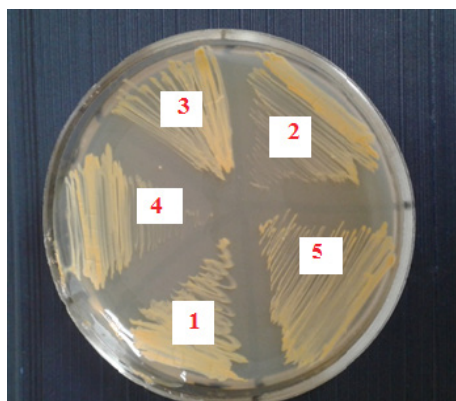


Рис. 1. Ріст *A. ferrooxidans* Lv red 9 (1), *A. ferrooxidans* Lv black 37 (2), *A. ferrooxidans* Lad 27 (3), *A. ferrooxidans* DTV 1 (4), *A. ferrooxidans* Lad 5 (5) в контрольних дослідах

Fig. 1. Growth of *A. ferrooxidans* Lv red 9 (1), *A. ferrooxidans* Lv black 37 (2), *A. ferrooxidans* Lad 27 (3), *A. ferrooxidans* DTV 1 (4), *A. ferrooxidans* Lad 5 (5) – control

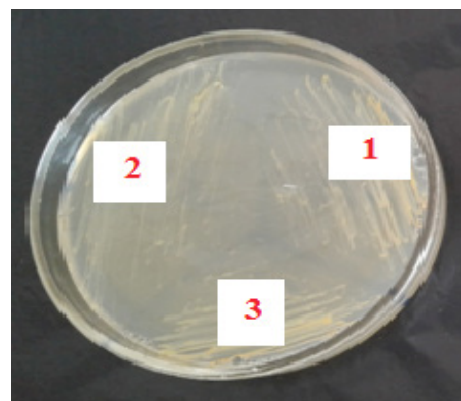


Рис. 2. Ріст *A. ferrooxidans* Lv red 9 (1), *A. ferrooxidans* DTV 1 (2), *A. ferrooxidans* Lv black 37 (3) в присутстві 0,70 г/дм³ Pb²⁺

Fig. 2. Growth of *A. ferrooxidans* Lv red 9 (1), *A. ferrooxidans* DTV 1 (2), *A. ferrooxidans* Lv black 37 (3) in the presence of 0,70 г/дм³ Pb²⁺

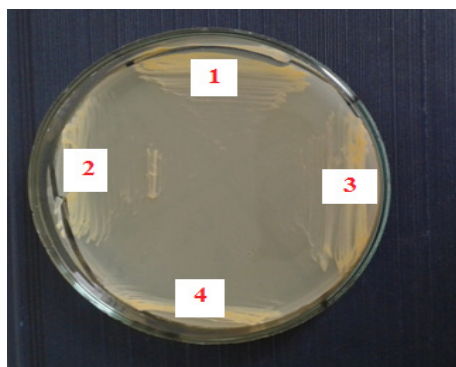


Рис. 3. Ріст *A. ferrooxidans* Lad 27 (1), *A. ferrooxidans* Lad 5 (2), *A. ferrooxidans* DTV 1 (3), *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (4) в присутстві 4,0 г/дм³ Zn²⁺

Fig.3. Growth of *A. ferrooxidans* Lad 27 (1), *A. ferrooxidans* Lad 5 (2), *A. ferrooxidans* DTV 1 (3), *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (4) in the presence of 4,0 г/дм³ Zn²⁺

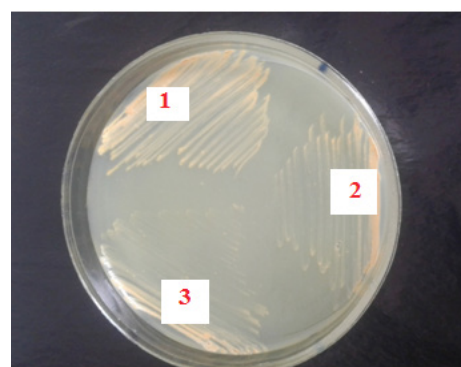


Рис. 4. Ріст *A. ferrooxidans* Lv red 9 (1), *A. ferrooxidans* Lv black 37 (2), *A. ferrooxidans* DTV 1 (3) в присутстві 6,8 г/дм³ Co²⁺

Fig.4. Growth of *A. ferrooxidans* Lv red 9 (1), *A. ferrooxidans* Lv black 37 (2), *A. ferrooxidans* DTV 1 (3) in the presence of 6,8 г/дм³ Co²⁺

Таблица 3

Минимальные ингибирующие концентрации (г/дм³) для штаммов,
изолированных из отходов ТЭК

Table 3

Minimum inhibitory concentrations (g/dm³) for strains isolated from dumps
by fuel-energy complex

Штамм	Ион металла					
	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺
<i>A. ferrooxidans</i> Lv red 9	11,5±0,5	8,1±0,3	0,70±0,05	9,9±0,4	6,8±0,3	5,6±0,3
<i>A. ferrooxidans</i> Lv black 37	11,5±0,5	6,1±0,3	0,70±0,05	9,9±0,4	6,8±0,3	7,5±0,3
<i>A. ferrooxidans</i> Lad 5	5,1±0,3	4,0±0,2	0,35±0,02	7,4±0,3	3,4±0,2	3,7±0,2
<i>A. ferrooxidans</i> Lad 27	11,5±0,5	4,0±0,2	0,35±0,02	9,9±0,5	5,1±0,3	5,6±0,3
<i>A. ferrooxidans</i> DTV 1	11,5±0,5	4,0±0,2	0,70±0,05	2,4±0,2	6,8±0,3	3,7±0,2
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	2,5±0,2	4,0±0,2	0,35±0,02	2,4±0,2	1,7±0,2	1,9±0,2
<i>A. thiooxidans</i> Lv black 6	5,1±0,3	6,1±0,3	0,35±0,02	4,9±0,3	3,4±0,2	3,7±0,3
<i>A. thiooxidans</i> Lv red 11	6,4±0,3	6,1±0,3	0,35±0,02	4,9±0,3	5,1±0,3	1,9±0,2
<i>Sulfobacillus</i> sp. Lad 29	10,2±0,4	8,1±0,4	0,70±0,05	9,9±0,4	6,8±0,3	5,6±0,3

лов для этих штаммов не отличались (табл. 3). Штаммы *A. ferrooxidans*, изолированные из отходов сжигания углей – золы уноса и золошлака, проявили меньшую устойчивость по отношению к ионам тяжелых металлов. Однако, несмотря на один и тот же источник выделения – зола уноса Ладыжинской ТЭС, МИК ионов металлов для *A. ferrooxidans* Lad 27 и *A. ferrooxidans* Lad 5 были различными. Так, уровень резистентности *A. ferrooxidans* Lad 27 достаточно высок и незначительно отличается от этого показателя для наиболее резистентных *A. ferrooxidans* Lv red 9 и *A. ferrooxidans* Lv black 37. В тоже время МИК ионов металлов для *A. ferrooxidans* Lad 5 была минимальной по сравнению со всеми исследуемыми штаммами. Выявленные внутри видовые различия бактерий могут быть связаны с их индивидуальными особенностями, в частности, локализацией генов устойчивости, влияющих на механизмы формирования резистентности (наличие внеклеточного барьера, активный транспорт ионов металлов и др.) [2, 6, 9].

Устойчивость бактерий штамма *A. ferrooxidans* DTV 1, изолированного из золошлака Добротворской ТЭС, к ионам меди и свинца была сравнима с этим показателем для *A. ferrooxidans* Lv red 9 и *A. ferrooxidans* Lv black 37, но уровень резистентности к другим металлам был в 1,5–4,0 раза меньше (табл. 3). При этом необходимо отметить, что в золе уноса и золошлаке концентрация большинства тяжелых металлов превышала их содержание в отвалах углеобогащения (табл. 2).

Отличия имели место и при сравнении резистентности представителей разных видов рода *Acidithiobacillus*, выделенных из одного и того же субстрата. Так, штаммы рода *Acidithiobacillus thiooxidans* Lv red 11 и *Acidithiobacillus thiooxidans* Lv black 6, изолированные из отвалов углеобогащения, проявляли минимальную устойчивость ко всем ионам металлов, по сравнению со штам-



мами *A. ferrooxidans* Lv red 9 и *A. ferrooxidans* Lv black 37. Эти штаммы обладали одинаковой устойчивостью к цинку и кадмию, но *A. thiooxidans* Lv red 11 оказался более устойчивым к меди и кобальту, а *A. thiooxidans* Lv black 6 – к никелю. Минимальный уровень резистентности штаммов *Acidithiobacillus thiooxidans* к металлам обусловлен использованием тиосульфата в качестве источника энергии. При использовании в качестве энергетического субстрата двухвалентного железа у *Acidithiobacillus ferrooxidans* вероятно происходит инактивация белков внешней мембраны и подавление ионных переносчиков, в результате чего снижается приток ионов металлов в клетку и, как следствие, их токсическое воздействие на клетки бактерий [7].

МИК ионов тяжелых металлов для умеренно термофильного штамма *Sulfobacillus* sp. Lad 29, изолированного из золы уноса Ладыжинской ТЭС, практически не отличались от полученных данных для *A. ferrooxidans*, изолированных из отвалов углеобогащения. В целом все выделенные штаммы были лучше адаптированы к росту в присутствии солей тяжелых металлов по сравнению с типовым *A. ferrooxidans* ATCC 23270. По мере убывания устойчивости всех изученных штаммов к ионам тяжелых металлов их можно расположить в ряд: *A. ferrooxidans* Lv red 9 \geq *A. ferrooxidans* Lv black 37 > *Sulfobacillus* sp. Lad 29 > *A. ferrooxidans* Lad 27 > *A. ferrooxidans* DTV 1 > *A. thiooxidans* Lv red 11 \geq *A. thiooxidans* Lv black 6 \geq *A. ferrooxidans* Lad 5 > *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

Полученные результаты свидетельствуют о высоком уровне резистентности бактерий, изолированных из отвальных продуктов ТЭК, к ионам тяжелых металлов. При этом минимальные концентрации металлов, при которых еще сохраняется жизнеспособность штаммов, в несколько раз превышают их содержание в отходах (табл. 1).

Полученные результаты согласуются с немногочисленными литературными данными, большинство из которых касаются резистентности АХБ, изолированных из природных сульфидных руд. Приводятся различные результаты об устойчивости *Acidithiobacillus ferrooxidans* к ионам тяжелых металлов, что связано с источником выделения и особенностями штаммов. Имеются данные о росте *Thiobacillus ferrooxidans*, выделенного из индийского медного рудника в присутствии 10,0 и 20,0 г/дм³ иона Cu²⁺, однако при этом показано снижение способности окислять железо практически на 80,0–90,0% [15]. В работе [16] указано, что уровни резистентности двух типовых штаммов *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 и *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 к меди отличались и составляли 25,0 и 6,2 г/дм³, соответственно. В работе Boyer A. et al [11] приводятся данные о толерантности бактерий штамма *Thiobacillus ferrooxidans* DSM 583 к 38,4 г/дм³ ионов Cu²⁺, однако уже при 44,8 г/дм³ Cu²⁺ полностью ингибировался рост бактерий указанного штамма. В работе [13] приведены данные по изучению устойчивости бактерий десяти штаммов *Thiobacillus ferrooxidans*, изолированных из урановых шахт и хвостохранилищ никелевых рудников, к меди, никелю, урану и торью. Имеются результаты ряда исследователей по устойчивости бактерий различных штаммов *A. ferrooxidans*, выделенных из природных сред и экспериментальных установок. Выявлена устойчивость *A. ferrooxidans* к 51,2 г/дм³ Cu²⁺,



70,7 г/дм³ Zn²⁺, 56,0 г/дм³ Cd²⁺ [8, 13]. Автори більшості робіт зв'язують різні рівні резистентності штамів з їх природною фізіологічною змінністю, залежною, в частині, від джерел виділення.

Таким чином, отримані результати дозволяють віднести штами АХБ, виділені з техногенного сировини, до полірезистентних, так як вони проявили високий рівень стійкості до широкого кола іонів важких металів в широкому діапазоні концентрацій. Результати досліджень свідчать про міжвидову та внутривидову різницю в резистентності досліджуваних штамів до іонів металів. Це може бути пов'язано з різними факторами фізіологічного та генетичного характеру: зниженням проникності клітинної стінки для іонів важких металів; утворенням великої кількості слизу, адсорбуючого та інактивуючого іони металів; наявністю у бактерій екстрацелюлярних факторів стійкості – плазмідів та транспозонів [2, 6, 9]. Якщо врахувати весь комплекс практично корисних властивостей виділених штамів з точки зору їх резистентності до іонів важких металів, а також встановлених раніше в роботі [10] швидкості росту, активності окислення заліза (II) як джерела енергії, здатності до адаптації та витривалості, найбільший інтерес представляють ізолювані з відходів вуглебагачення мезофільні штами *A. ferrooxidans* Lv black 37 та *A. ferrooxidans* Lv red 9. Ці результати значно розширили можливості застосування біотехнологічних методів переробки як природного так і техногенного сировини та лягли в основу розробки ефективного уніфікованого бактеріального препарату, здатного витягувати метали з техногенних субстратів ТЭК України з високими показателями.

**І. А. Блайда, Т. В. Васильєва, Л. І. Слюсаренко,
Н. Ю. Васильєва**

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

СТІЙКІСТЬ ДО ВАЖКИХ МЕТАЛІВ АЦИДОФІЛЬНИХ ХЕМОЛІТОТРОФНИХ БАКТЕРІЙ, ЩО ВИДИЛЕНІ З ТЕХНОГЕННОЇ СИРОВИНИ

Реферат

Мета. Визначення стійкості до іонів важких металів ацидофільних хемолітотрофних бактерій, що ізолювані з відходів паливно-енергетичного комплексу України. **Методи.** Бактерії культивували на агаризованому середовищі Сільвермана-Лундгрема 9К у присутності іонів міді, цинку, нікелю, кобальту і кадмію в діапазоні концентрацій 0,5–12,0 г/дм³ з інтервалом 0,5 г/дм³, іонів свинцю – в діапазоні 0,25–1,50 г/дм³ з інтервалом 0,05 г/дм³, мезофільні бактерії культивували при 35,0 ± 0,2 °С, помірно термофільні – при 50,0 ± 0,2 °С протягом семи діб. Облік результатів здійснювали візуально, порівнюючи дослідні варіанти з контрольними; за контроль слугувало середовище 9К без іонів металів. **Результати.** Отримані результати свідчать про



високий рівень резистентності ізолюваних бактерій родів *Acidithiobacillus* і *Sulfobacillus* до різних іонів важких металів. Мінімальні пригнічувальні концентрації металів для вивчених штамів в кілька разів перевищували їх вміст у відвальних породах паливно-енергетичного комплексу. Встановлено ряд токсичності іонів металів по відношенню до виділених штамів: найбільш токсичним виявився іон Pb^{2+} (МІК для всіх штамів знаходилася в діапазоні 0,35–0,70 г/дм³), найменш токсичним – іон Cu^{2+} (МІК досягала 11,5 г/дм³). Визначено ряд стійкості ізолюваних штамів ацидофільних хемолітотрофних бактерій родів *Acidithiobacillus* і *Sulfobacillus* по відношенню до іонів токсичних металів. Максимальною стійкістю володіли штами, ізолювані з відходів збагачення вугілля, мінімальною – штами, ізолювані з відходів спалювання вугілля, а також колекційний штамі. **Висновки.** Виділені з техногенної сировини штами ацидофільних хемолітотрофних бактерій відносяться до полірезистентних, так як вони проявили високий рівень стійкості до широкого кола іонів важких металів в широкому діапазоні концентрацій. Резистентність штамів залежить від їх індивідуальних особливостей і джерел виділення. Виявлено міжвидові і внутрішньовидові відмінності штамів за резистентністю, що може бути пов'язано з різними чинниками фізіологічного і генетичного характеру.

Ключові слова: ацидофільні хемолітотрофні бактерії, відвальні продукти паливно-енергетичного комплексу, резистентність, іони важких металів.

I. Blayda, T. Vasylieva, L. Sliusarenko, N. Vasylieva

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: iblayda@ukr.net

RESISTANCE OF ACIDOPHILIC CHEMOLYTOTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM TECHNOGENIC RAW MATERIALS TO HEAVY METALS

Summary

Aim. Determination of resistance to heavy metal ions of acidophilic chemolithotrophic bacteria isolated from dump products of fuel-energy complex of Ukraine. **Methods.** Traditional microbiological: cultivation of strains were carried out with using of Silverman-Lundgren 9K medium in the presence of copper, zinc, nickel, cobalt and cadmium ions in the concentration range 0.5–12.0 g/dm³ at intervals 0,5 g/dm³, in the presence of lead in the concentration range 0.25–1.50 g/dm³ at intervals 0,05 g/dm³; crops carried out with a stroke; cultivation of mesophilic strains was carried out at the temperature of 35.0±0.2 °C, moderately thermophilic – at 50.0±0.2 °C within seven days; the results were recorded visually by comparing the experimental options with the control ones; the control was 9K medium without metal ions. **Results.** The results indicate a high level of resistance of isolated strains of the genera *Acidithiobacillus* and *Sulfobacillus* to various heavy metal ions. The metals minimum inhibitory concentrations (MIC) for the studied strains were several times higher than their content in dump products



of fuel-energy complex. A series of metal ions toxicity in relation to the isolated strains has been established: Pb^{2+} ion was the most toxic (MIC for all the strains it was in the range of 0.35–0.70 g/dm³), the least toxic was Cu^{2+} ion (MIC reached 11.5 g/dm³). A number of resistances of isolated acidophilic chemolithotrophic bacteria of the genera *Acidithiobacillus* and *Sulfobacillus* with respect to toxic metal ions has been determined. The strains isolated from coal waste dumps possessed the maximum resistance, the minimal strains were those isolated from coal burning wastes, as well as the typical ones. **Conclusion.** The strains of acidophilic chemolithotrophic bacteria isolated from technogenic raw materials belong to multiresistant ones, since they showed a high level of resistance to a wide range of heavy metal ions in a wide range of concentrations. The resistance of strains depends on their individual characteristics and sources of isolation. Identified interspecific and intraspecific differences of the strains by their resistance, is associated with various physiological and genetic factors.

Key words: acidophilic chemolithotrophic bacteria, dumps of fuel-energy complex, resistance, heavy metal ions.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карпинець Л., Лобачевська О., Баранов В., Дяків С., Гнатуш С. Вміст загального нітрогену і важких металів у гаметофіті мохів та поверхневому шарі техногенного субстрату шахтних відвалів // Біологічні Студії. – 2017. – Т. 11, № 1. – 101-108. DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1101.521>
2. Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С. Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2007. – Т. 45. – С. 3–28.
3. Таширев А. Б., Рокитко П. В., Левшико А. С., Романовская В. А., Таширева. А. А. Устойчивость к токсичным металлам хемоорганотрофных бактерий, изолированных из антарктических клифов // Микробиол. журн.– 2012. – Т. 74, № 2. – С. 3–7.
4. Таширев А. Б., Рокитко П. В., Сулова О. С. Устойчивость микроорганизмов карстовых полостей мушкарова яма и куйбышевская к соединениям токсичной меди (II) // Вода: Химия и экология. – 2015. – № 1. – С. 64–72.
5. Теплая Г. А. Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды. Обзор // Астраханский вестник экологического образования. – 2013. – Т. 1, № 23.– С. 182–192.
6. Янева О. Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов // Микробиол. журн. – 2009. – Т. 71, № 6. – С. 54–65.
7. Almarcegui R. J., Navarro C. A., Paradela A., Albar J.P., et al. Response to copper of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 grown in elemental sulfur // Research in Microbiology. – 2014. – Vol. 165. – P. 761–772. doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.005.
8. Baillet F., Magnin J. P., Cheruy J. P., Ozil P. Cadmium Tolerance and Uptake by a *Thiobacillus ferrooxidans* Biomass // Environmental Technology. – 1997. – Vol. 18, № 6. – P. 631–637. doi: 10.1080/09593331808616581.
9. Banerjee C. Genetics of metal resistance in acidophilic prokaryotes of acidic mine environments // Indian Journal of Experimental Biology. – 2004. – Vol. 42. – P. 9–25. doi 10.1099/mic.0.037143-0



10. I. Blayda, T. Vasylieva, L. Sliusarenko, N. Vasylieva, V. Baranov, S. Shuliakova. Isolation and Study of the Main Properties of Acidophilic Chemolithotrophic Bacteria Isolated from the Waste Dumps of Fuel-energy Complex of Ukraine // *Studia Biologica*. – 2018. – V. 12, № 3–4. – С. 3–16. DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1203.570>
11. Boyer A., Magnin J.-P., Ozil P. Copper ion removal by *Thiobacillus ferrooxidans* biomass // *Biotechnology Letters*. – 1998. – Vol. 20, № 2. – P. 187–190.
12. Gadd G. M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation // *Microbiology*. – 2010. – Vol. 156. – P. 609–643. doi 10.1099/mic.0.037143-0.
13. Kondratyeva F. Tamara, Muntyan N. Lyudmila, Karavaiko I. Grygory. Zinc- and arsenic-resistant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* have increased copy numbers of chromosomal resistance genes // *Microbiology*. – 1995. – Vol. 141. – P. 1157–1162. doi: 10.1099/13500872-141-5-1157
14. Kuzmishyna S, Hnatush S, Moroz O, Karpinets L, Baranov V. Microbiota of Chervonograd Mining Region. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*. – 2014. – T. 67. – С. 234–242.
15. Natarajan K. A., Sudeesha K., Ramananda G. Rao. Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans* // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1994. – Vol. 66. – P. 303–306. doi:10.1007/BF00882764
16. Orellana L. H., Jerez C. A. A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – 92, № 4. – P. 761–767. doi: 10.1007/s00253-011-3494-x
17. Tuovinen O. H., Niemelä S. I., Gyllenberg H. G. Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1971. – Vol. 37, № 1. – P. 489–496. doi: 10.1007/BF02218519

References

1. Karpinets L, Lobachevska O, Baranov V, Diakiv S, Hnatush S. Total Content of Nitrogen and Heavy Metals in the Mosses Gametophyte and in Upper Layer of Technogenic Substrates of the Mine Dumps. *Studia Biologica*. 2017;11(1):101-8. (In Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1101.521>
2. Kushkevych I, Gnatush S, Gudz S. Vplyv vazhkyx metaliv na klityny mikroorganizmiv. *Visnyk Lviv. un-tu. Seriya biologichna*. 2007; 45: 3–28. (In Ukrainian).
3. Tashyrev AB, Rokitko PV, Levishko AS, Romanovskaya VA, Tashyreva AA. Ustoychivost k toksichnyim metallam hemoorganotrofnih bakteriy, izolirovannyih iz antarkticheskikh klifov. *Mikrobiol. Zhurn.* 2012; 74(2): 3–7 (in Russian)
4. Tashyrev AB, Rokitko PV, Suslova OS. Ustoychivost mikroorganizmov karstovyyih polostey mushkarova yama i kuybyishevskaya k soedineniyam toksichnoy medi (II). *Voda: Himiya i ekologiya*. 2015; 1: 64–72. (in Russian)
5. Teplaya GA. Tyazhelye metallyi kak faktor zagryazneniya okruzhayushey sredy. *Obzor. Astrahanskiy vestnik ekologicheskogo obrazovaniya*. 2013; 1(23): 182–192. (in Russian)
6. Ianieva OD. Mehanizmyi ustoychivosti bakteriy k ionam tyazhelyih



metallov. Mikrobiol. Zhurn. 2009; 71(6): 54–65. (in Russian)

7. *Almarcegui RJ, Navarro CA, Paradela A, Albar JP et al.* Response to copper of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 grown in elemental sulfur. Research in Microbiology. 2014; 165: 761–772. doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.005.

8. *Baillet F, Magnin JP, Cheruy JP, Ozil P.* Cadmium Tolerance and Uptake by a *Thiobacillus Ferrooxidans* Biomass, Environmental Technology. 1997; 18(6): 631–637. doi: 10.1080/09593331808616581.

9. *Banerjee C.* Genetics of metal resistance in acidophilic prokaryotes of acidic mine environments. Indian Journal of Experimental Biology. 2004; (42): 9–25. doi 10.1099/mic.0.037143-0

10. *Blayda I, Vasylieva T, Sliusarenko L, Vasylieva N, Baranov V, Shuliakova S.* Isolation and Study of the Main Properties of Acidophilic Chemolithotrophic Bacteria Isolated from the Waste Dumps of Fuel-energy Complex of Ukraine. Studia Biologica. 2018; 12(3-4): 3-16. DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1203.570>.

11. *Boyer A, Magnin JP, Ozil P.* Copper ion removal by *Thiobacillus ferrooxidans* biomass. Biotechnology Letters. 1998; 20(2): 87–190.

12. *Gadd GM.* Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology. 2010; 156: 609–643. DOI 10.1099/mic.0.037143-0

13. *Kondratyeva TF, Muntyan LN, Karavaiko GI.* Zinc- and arsenic-resistant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* have increased copy numbers of chromosomal resistance genes. Microbiology. 1995; 141: 1157-1162. doi: 10.1099/13500872-141-5-1157

14. *Kuzmishyna S, Hnatysh S, Moroz O, Karpinets L, Baranov V.* Microbiota Of Chervonograd Mining Region. Visnyk of the Lviv University. Series Biology. 2014;67:234-42.

15. *Natarajan KA, Sudeesha K, Ramananda GR.* Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. Antonie van Leeuwenhoek. 1994; 66: 303–306. doi:10.1007/BF00882764

16. *Orellana LH, Jerez CA.* A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;92(4): 761-767. doi: 10.1007/s00253-011-3494-x

17. *Tuovinen OH, Niemelä SI, Gyllenberg HG.* Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. Antonie van Leeuwenhoek. 1971; 37(1): 489-496.

Стаття надійшла до редакції 14.03.2019 р.



УДК 579.695

**Т. В. Гудзенко, І. П. Конуп, О. В. Волювач, О. Г. Горшкова,
Т. О. Беляєва, М. М. Чабан**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

ВИЛУЧЕННЯ ФЕНОЛУ З ВОДИ БАКТЕРІЯМИ *BACILLUS SUBTILIS* ONU551, АДГЕЗОВАНИМИ НА НОСІЯХ РІЗНОЇ ПРИРОДИ

Мета. Дослідження ефективності вилучення фенолу з води адгезованими на носіях різної природи бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551. **Методи.** Концентрацію фенолу у воді визначали екстракційно-фотометричним методом з використанням 4-аміноантпірину. Достовірність відмінностей між середніми значеннями залишкової концентрації фенолу у воді визначали за критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95% ($p \leq 0,05$). Опрацювання даних здійснювали з використанням програми "Microsoft Office Excel 2003". **Результати.** Експериментально встановлено здатність бактерій штаму *B. subtilis* ONU551, виділених із стічної води виробництва фармацевтичних препаратів, окиснювати фенол. Концентрація фенолу у воді за її обробки вільними клітинами штаму *B. subtilis* ONU551 у кількості $5,5 \times 10^5$ КУО/мл протягом 5 діб експозиції зменшувалася з 200,0 до $112,0 \pm 5,5$ мг/л (на 44%), сягаючи максимуму на 15 добу – ступінь вилучення фенолу з води склав 99–100%. Адгезія бактерій *B. subtilis* ONU551 до поверхні природних (цеоліт, торф, активоване вугілля, пісок) та синтетичних (керамічні трубки, волокнисті насадки типу «ВІЯ») носіїв призводила до прискорення процесу вилучення фенолу з води в 1,4–2,5 рази, в порівнянні з обробкою води вільними клітинами бактерій. Залишкова концентрація фенолу у воді за її обробки бактеріями *B. subtilis* ONU551, адгезованими на піску і на волокнистій насадці типу «ВІЯ», зменшувалася на 6 добу з 200,0 мг/л до $9,0 \pm 0,25$ мг/л і $6,0 \pm 0,54$ мг/л відповідно (на 95–96%) та на 11 добу знаходилася на рівні гранично-допустимої концентрації (0,001 мг/л). Ступінь вилучення фенолу з води бактеріями *B. subtilis* ONU 551, адгезованими на стулках мідій, торфі та на цеоліті, наприкінці очищення (11 діб) коливався в межах від 87% до 99% та сягав 100% – при використанні активованого вугілля, керамічних трубок як носіїв. **Висновок.** Використання бактерій *B. subtilis* ONU551, адгезованих на природних і синтетичних носіях – мушлях мідій, торфі, піску та волокнистій насадці типу «ВІЯ» забезпечує 100% вилучення фенолу з води.

Ключові слова: *Bacillus subtilis*, адгезія, фенол, окиснення, природні і синтетичні носії.



Серед великої кількості речовин, що забруднюють навколишнє середовище, поряд з нафтопродуктами, циклічними органічними сполуками і важкими металами, вкрай небезпечними є фенольні сполуки, що володіють високою канцерогенною і мутагенною активністю. Це пов'язано з їх високою токсичністю і широким розповсюдженням частково окиснених похідних ароматичних вуглеводнів. Джерелами надходження фенолів у природні водні об'єкти є побутові стоки та стоки медичних закладів, підприємств нафтохімічного комплексу та промислових підприємств, зокрема хіміко-фармацевтичного підприємства [2].

На сьогоднішній день найбільш економічно вигідною обробкою промислових і господарських побутових стоків, що містять органічні поллютанти, зокрема фенол, є їх біологічна обробка за дії мікроорганізмів – деструкторів [6].

Із даних літератури відомо, що бактерії роду *Bacillus* володіють значним біотехнологічним потенціалом [7]. Мікробні спільноти бактерій роду *Bacillus* відрізняються високою автономністю і тісними кооперативними зв'язками, а високо- і низькомолекулярні органічні речовини, в тому числі токсичні фенольні сполуки, використовуються ними в багатоступеневому процесі аеробної і анаеробної деструкції [4, 8, 10, 12, 13].

Мета роботи – дослідження ефективності вилучення фенолу з води адгезованими на носіях різної природи бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551.

Матеріали та методи

Об'єкт дослідження – процес вилучення фенолу з води бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на природних і синтетичних носіях.

Попередньо було встановлено, що бактерії *Bacillus subtilis* ONU551, ізольовані із стічних вод виробництва фармацевтичних препаратів, виявляють біохімічну активність щодо токсичного фенолу та інших важкоокиснювальних сполук, зокрема до катіонної поверхнево-активної речовини – N-цетилпіридинію бромистого [14]. Цей штам попередньо за сукупністю морфологічних, фізіолого-біохімічних, культуральних властивостей, визначених з використанням класичних бактеріологічних методів та тест-системи API 50 CHB Medium (bioMérieux, Франція) був віднесений до виду *Bacillus spp.* [9]. За жирнокислотним складом, спектр якого одержано на газовому хроматографі Agilent 7890 і розшифровано з використанням бібліотечної бази даних RTSBA6 6.21 програми MIDI Sherlock, досліджуваний штам *Bacillus spp.* з високим індексом подібності (Sim Index > 0,72) ідентифіковано як *Bacillus subtilis*. Він не є патогенним і на сьогоднішній день зберігається в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова – *Bacillus subtilis* ONU551.

Штам *Bacillus subtilis* ONU551 представлений рухливими, грам-позитивними паличками розміром 1,5–1,7 × 5,5–5,8 мкм із закругленими кінцями. Клітини розташовуються поодинокі, а також у вигляді ланцюжка, V-подібно. Колонії світло-коричневі, щільні, гладенькі з рівним краєм. Бактерії ростуть у м'ясо-пептонному бульйоні з утворенням плівки. При рості в м'ясо-пептонному бульйоні з 7,5% NaCl утворюється пухкий осад. Штам *Bacillus subtilis*



ONU551 дає негативну реакцію з метиловим червоним і негативну реакцію Фогеса-Проскауера, сірководень не утворює. Бактерії каталазо-позитивні, оксидазо-негативні, гідролізують крохмаль і сечовину, пептонізують молоко. Штам *Bacillus subtilis* ONU551 не відновлює нітрати до нітритів, не розріджує желатин; ферментує глюкозу, сахарозу, маніт з утворенням кислоти. Метаболізм штаму *Bacillus subtilis* ONU551 – окиснювальний.

Підготовка бактерій – деструкторів фенолу. Штам *Bacillus subtilis* ONU551 (попередньо адаптований до високих концентрацій фенолу 200–300 мг/л), для інокуляції носіїв вирощували на чашках Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) одну добу. Отриману бактеріальну масу перенесли (методом змиву) в колби Ерленмеєра, ємністю один літр. Попередньо в ці колби вносили 500 мл повного живильного середовища М9 складу (г/л): Na_2HPO_4 – 6; KH_2PO_4 – 3; NH_4Cl – 1; NaCl – 0,5; пептон – 10; дріжджовий екстракт – 5; глюкоза – 2.

Глюкозу стерилізували при 0,5 атм, потім додавали в живильне середовище М9. Бактерії культивували протягом 1,5–2 діб до досягнення густини 10^9 кл/мл. Оптичну густину клітинної суспензії визначали на ФЕК з довжиною хвилі 540 нм.

Підготовка носіїв бактерій – деструкторів фенолу. Використовували такі носії для адгезії клітин бактерій *Bacillus subtilis* ONU551: цеоліт (57 г), мушлі мідій (43 г), пісок (93 г), керамічні трубки (44,2 г), активоване вугілля (13 г), торф верховий (7,5 г), синтетичний носій типу «ВІЯ» ТУ995990 (2,3 г) [15] у кількості 1:2 за об'ємом. Вибір носіїв зумовлений їх доступністю, дешевизною та розвиненою питомою площею поверхні, що є найважливішим і основним технологічним параметром для проведення ефективного процесу вилучення фенолу з води.

Цеоліт, мушлі мідій і річковий пісок попередньо відмивали від дрібної дисперсної фази. Неорганічні носії (цеоліт, мушлі мідій, річковий пісок, активоване вугілля, кільця керамічні) стерилізували в жаровій шафі за температури 180 °С. Попередньо мушлі мідій для випалювання органічної фази піддавали обробці високою температурою – 250–300 °С протягом 0,5 год у жаровій шафі. Торф і синтетичний носій стерилізували в автоклаві при 1,0 атм. протягом 30 хвилин.

Для експериментів використовували цеоліт з розміром гранул 0,3–0,7 см; мушлі мідій з розміром пластин 0,5–1,0 см; розмір гранул активованого вугілля 3–4 мм; розміри керамічних трубок: діаметр 8 мм, довжина 10 мм, товщина стінок 1,5 мм.

Отриманими стерильними носіями заповнювали стерильні флакони, ємністю 0,5 л. У кожен з флаконів вносили рівні об'єми (50 мл) носіїв. Після цього в ці флакони вносили по 50 мл інокуляту бактерій *Bacillus subtilis* ONU551. Проводили окремі серії досліджень (5 серій випробувань). Інокуляцію проводили в термостатованому шейкері Innova'40 (швидкість обертання ротора 70 об / хв при температурі 28 °С) протягом 2-х діб. Після проведення інокуляції залишки суспензії бактерій зливали і інокульовані носії тричі промивали середовищем М9 (використовували тільки мінеральні компоненти середовища: Na_2HPO_4 – 6; KH_2PO_4 – 3; NH_4Cl – 1; NaCl – 0,5 – 2, г/літр). В кожен з флаконів



додавали по 50 мл мінерального середовища М9, що містив 200 мг/л фенолу.

Оцінку фенол-окиснювальної активності вільних клітин бактерій *Bacillus subtilis* ONU551 здійснювали за ступенем вилучення фенолу з води (α ,%), що розраховували за рівнянням:

$$\alpha = [(C_0 - C) / C_0] \times 1 \quad (1)$$

де C_0 і C – концентрації фенолу у воді до (200 мг/л) та після обробки.

Ефективність процесу вилучення фенолу з води бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на різних носіях, оцінювали за рівнянням (1). Концентрацію фенолу у контрольних і дослідних пробах до і після обробки визначали фотокolorиметричним методом, оснований на утворенні забарвлених сполук фенолу з 4-аміноантипірином за присутності гексаціаноферату (III) при рН=10,0±0,2 [5].

Достовірність відмінностей між середніми значеннями залишкової концентрації фенолу у воді визначали за критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95% ($p \leq 0,05$). Опрацювання даних здійснювали з використанням програми «Microsoft Office Excel 2003».

Результати досліджень та їх обговорення

Експериментально встановлено здатність бактерій штаму *Bacillus subtilis* ONU551, виділених із стічної води виробництва фармацевтичних препаратів, окиснювати фенол. Результати оцінки фенол-окиснювальної здатності бактерій *Bacillus subtilis* ONU551 представлені в табл. 1.

Таблица 1

Окиснення фенолу бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551

Table 1

Oxidation of phenol by the bacteria *Bacillus subtilis* ONU551

Доба	Ступінь вилучення фенолу із води, %	Концентрація фенолу у воді, мг/л
5	44	112,0±5,5
8	80	40,0±3,7
15	99	0,05±0,08

Примітка: $M \pm m$ при $P < 0,05$; концентрація фенолу у воді до обробки – 200,0 мг/л; концентрація бактеріальних клітин – $5,5 \times 10^5$ КУО/мл

Note: $M \pm m$ at $P < 0,05$; concentration of phenol in water before treatment – 200,0 mg/l; concentration of bacterial cells is $5,5 \times 10^5$ CFU/ml

У результаті досліджень встановлено, що при одноразовому введенні вільних клітин штаму *Bacillus subtilis* ONU551 у кількості $5,5 \times 10^5$ КУО/мл у забруднену фенолом воду на 5 добу експозиції концентрація фенолу у воді зменшувалася з 200,0 мг/л до 112,0±5,5 мг/л (ступінь вилучення фенолу з води – 44%). На 8 добу експозиції ступінь вилучення фенолу з води підвищувався до 80%, сягаючи максимуму (99–100%) на 15 добу [14].

Для підвищення ефективності вилучення фенолу з водних розчинів використовували клітини бактерій *B. subtilis* ONU551, адгезовані на деше-



вих легкодоступних носіях природного та синтетичного походження: цеоліті, подрібнених мушлях мідій, піску, керамічних трубках, активованому вугіллі, торфі верховому, синтетичному носії типу “ВІЯ”. Відомо, що в даний час спектр матеріалів для використання в біотехнологіях очищення води від плютантів дуже різноманітний (це диски, пластини, насадки з полімерних матеріалів, неткане полотно тощо [11, 15], основна вимога до них – інертність і принципова можливість утворення на них біоплівки.

Попередньо було проведено експериментальну оцінку сорбційної здатності цеоліту, подрібнених мушлів мідій, піску, керамічних трубок, активованого вугілля, торфу верхового, синтетичного носія типу “ВІЯ” по відношенню до фенолу з концентрацією 200 мг/л за присутності мінеральних компонентів М-9 при рН ~7 і температурі 18 ± 2 °С. Результати хімічного аналізу визначення залишкової концентрації фенолу у воді за її обробки усіма вищезгаданими носіями представлені в табл. 2.

Як видно з табл. 2, випробувані носії слабо адсорбують фенол, за винятком активованого вугілля. Активоване вугілля на 6-ту добу експериментів адсорбує біля 85% фенолу. Показано, що за відсутності біологічної модифікації певною адсорбційною здатністю до фенолу володіють також синтетичний носій типу “ВІЯ” та торф. Протягом перших 24 годин сорбції концентрація фенолу у воді зменшувалася з 200 мг/л до $90 \pm 8,7$ мг/л (55% вилучення) при використанні активованого вугілля; до $125 \pm 10,5$ мг/л (38% вилучення) – при використанні синтетичного носія типу “ВІЯ” та до $160 \pm 15,2$ мг/л (20% вилучення) – при використанні торфу. Додатково встановлено, що протягом 30 хв експозиції сорбція фенолу із водних розчинів спостерігалася лише при використанні активованого вугілля (за визначених умов ступінь вилучення фенолу із водних розчинів активованим вугіллям за відсутності мікроорганізмів становив 28%).

Через три доби ефективність процесу вилучення фенолу із води сягала близько 84% при використанні активованого вугілля (залишкова концентрація фенолу у воді становила $32,0 \pm 2,4$ мг/л); практично не змінювалася для торфу і була на рівні 20–22% (залишкова концентрація фенолу у воді становила $157 \pm 14,5$ мг/л) та, мабуть, внаслідок процесу десорбції зменшувалася до 17% для синтетичного носія типу “ВІЯ”.

З подальшим подовженням терміну обробки води зазначеними носіями (до 10–11 діб) її ефективність збільшувалася для активованого вугілля до 97% та залишалася практично незмінною при використанні торфу верхового, синтетичного носія типу “ВІЯ”. Практично інертними по відношенню до фенолу були пісок, цеоліт та мушлі мідій (~3% на 2 добу). Експериментально показано, що усі використані матеріали є “біологічно позитивними”.

Встановлено, що за умов адгезії на поверхні піску, цеоліту та мушлях мідій (що практично не сорбують фенол) бактерій *Bacillus subtilis* ONU551 вдається збільшити протягом першої доби експозиції ступінь вилучення фенолу з води до 18–26%.

Найбільш ефективно процес вилучення фенолу з водних розчинів (через добу від початку експерименту) протікав у разі використання клітин *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованих на носіїві з найбільшою сорбційною



емністю – активованому вугіллі; ступінь вилучення фенолу з води сягав 62% (з урахуванням поправки на контроль – активоване вугілля за відсутності мікроорганізмів), що відповідало залишковій концентрації фенолу у воді $34,0 \pm 2,8$ мг/л.

Таблиця 2

Вилучення фенолу з води бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на носіях різної природи

Table 2

Removal of phenol from water by bacteria *Bacillus subtilis* ONU551, adhered on the carriers of different nature

Бактерії <i>B. subtilis</i> ONU551, адгезовані на носіях	Концентрація фенолу у воді після обробки, мг/л (% вилучення з поправкою на контроль)				
	Час експозиції, доба				
	1	4	6	8	11
Цеоліт Контроль	$\frac{163,5 \pm 12,5}{199,8 \pm 16,0}$ (18%)	$\frac{163,5 \pm 12,0}{---$	$\frac{119 \pm 12,4}{195 \pm 16,1}$ (39%)	$\frac{2,0 \pm 0,15}{---$	$\frac{2,0 \pm 0,15}{193 \pm 16,1}$ (99%)
Мушлі мідій Контроль	$\frac{145 \pm 12,0}{195 \pm 16,5}$ (26%)	$\frac{145 \pm 11,2}{---$	$\frac{136 \pm 11,2}{182,5 \pm 17,4}$ (26%)	$\frac{136 \pm 10,4}{---$	$\frac{20 \pm 1,25}{159 \pm 12,5}$ (87%)
Торф Контроль	$\frac{118 \pm 10,5}{160 \pm 15,2}$ (26%)	$\frac{24 \pm 1,8}{---$	$\frac{28 \pm 2,5}{157 \pm 14,5}$ (82%)	$\frac{24 \pm 1,8}{---$	$\frac{16 \pm 0,85}{159 \pm 15,2}$ (90%)
Активоване вугілля Контроль	$\frac{34,0 \pm 2,8}{90 \pm 8,7}$ (62%)	$\frac{9,0 \pm 0,72}{---$	$\frac{9,0 \pm 0,65}{32,0 \pm 2,4}$ (72%)	$\frac{4,0 \pm 0,38}{---$	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{6,0 \pm 0,5}$ (100%)
Пісок Контроль	$\frac{163,5 \pm 15,6}{200 \pm 17,0}$ (18%)	$\frac{154,0 \pm 14,4}{---$	$\frac{9,0 \pm 0,85}{187,5 \pm 17,9}$ (95%)	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{---$	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{174 \pm 16,2}$ (100%)
Керамічні трубки Контроль	$\frac{173 \pm 14,1}{178 \pm 15,8}$ (3%)	$\frac{163,5 \pm 15,5}{---$	$\frac{100,0 \pm 9,7}{178 \pm 16,0}$ (44%)	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{---$	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{167 \pm 15,9}$ (100%)
«ВІЯ» Контроль	$\frac{113 \pm 12,2}{125 \pm 10,5}$ (10%)	$\frac{8,0 \pm 0,94}{---$	$\frac{6,0 \pm 0,54}{167 \pm 15,2}$ (96%)	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{---$	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{159 \pm 14,8}$ (100%)

Примітка: $M \pm m$ при $P < 0,05$; "—" не визначено; концентрація фенолу у воді до обробки – 200,0 мг/л; концентрація бактеріальних клітин – 10×10^9 КУО/мл; рН 6,8–7,2.

Note: $M \pm m$ at $P < 0.05$; "—" undefined; concentration of phenol in water before treatment – 200,0 mg/l; concentration of bacterial cells is 10×10^9 CFU/ml; pH 6,8–7,2.

Адгезія клітин бактерій *Bacillus subtilis* ONU551 на носіях призводила до стабілізації процесу вилучення фенолу з водних розчинів (не відбувалося процесу десорбції, як наприклад, у разі використання синтетичного волокна «ВІЯ» за відсутності мікроорганізмів) та його прискоренням у 1,4–2,5 рази порівняно з обробкою води вільними клітинами бактерій (табл. 1, 2).

Експериментально встановлено, що вже на 6 добу залишкова концен-



трація фенолу у воді за її обробки бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на піску або на волокнистій насадці типу «ВІЯ», зменшувалася з 200,0 мг/л до $9,0 \pm 0,25$ мг/л і $6,0 \pm 0,54$ мг/л відповідно. При цьому ступінь вилучення фенолу із води становив 95–96% з урахуванням поправки на контроль (носії за відсутності мікроорганізмів) (табл. 2).

Як видно із табл. 2, бактерії *Bacillus subtilis* ONU551, адгезовані на цеоліті протягом першої доби проявляють слабку біохімічну активність по відношенню до фенолу. На 6-у добу спостерігається деструкція на 39% і тільки на 11-у добу бактеріями утилізовано 98–99% фенолу. Кінетика деструкції фенолу бактеріями, адгезованими на мушлях мідій теж знаходилася на низькому рівні. Швидкість утилізації фенолу бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на піску значно вище за тих, що були адгезовані на цеоліті і мішлях мідій. До 6-го дня проведення експерименту деструкція фенолу сягала 95%. Швидкість деструкції фенолу бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, що були прикріплені до керамічних трубок, повторюють дані у випадку їх прикріплення до цеоліту.

Експериментально підтверджено, що через 11 діб адгезовані на активованому вугіллі, піску, керамічних трубках, синтетичному носії типу "ВІЯ" бактерії *Bacillus subtilis* ONU551 зменшували концентрацію фенолу до рівня гранично-допустимої концентрації (ГДК для водних об'єктів господарсько-питного та культурно-побутового користування становить 0,001 мг/л) [1].

Механізм взаємодії штаму *Bacillus subtilis* ONU551 з фенолом досить складний і включає поєднання декількох біохімічних реакцій [3]. Початковий етап біодеградації фенолу супроводжується утворенням катехолу. Наступна стадія метаболізму двоатомного фенолу *Bacillus subtilis* ONU551 пов'язана з розщепленням ароматичного кільця. Утворений двоатомний фенол – катехол в аеробних умовах підлягає інтрадіольному *o*-розщепленню або екстрадіольному *m*-розщепленню. Ці шляхи розщеплення ароматичного кільця каталізуються різними діоксигеназами. Розщеплення кільця за *o*-шляхом каталізує 1,2 -діоксигеназа, а розщеплення кільця за *m*-шляхом каталізує 2,3-діоксигеназа.

Таким чином, біохімічно активний штам *Bacillus subtilis* ONU551 може бути рекомендований для розробки біотехнології очищення стічних вод хімічних, фармацевтичних виробництв, нафтохімічного комплексу, медичних установ від токсичних органічних забруднювачів (нафтопродуктів, широко розповсюдженого представника катіонних поверхнево-активних – галогеніду *N*-цетилпіридинію [14]), зокрема від фенолу. Очищена від фенолу вода може бути використана повторно для виробничих цілей. Основні переваги використання адгезованих на природних та синтетичних носіях бактерій *Bacillus subtilis* ONU551: висока ефективність, відсутність вторинного забруднення, простота здійснення процесу очищення води, зокрема від фенолу, що є "промислово використовуваним", не вимагає кардинальних змін в технології виробництва. Можна рекомендувати включити до композиції носіїв очисних споруд найбільш активні носії бактерій – мушлі мідій, торф, пісок та волокнисту насадку типу "ВІЯ", тому що адгезовані на них бактерії *Bacillus subtilis* ONU551 проявляють істотну біохімічну активність по відношенню до фенолу



(з вихідною концентрацією 200 мг/л) і ці носії необхідні для стабільної роботи очисних споруд, враховуючи їх хороші механічні і фізико-хімічні властивості.

Експериментально встановлено здатність штаму бактерій *Bacillus subtilis* ONU551, виділених із стічної води виробництва фармацевтичних препаратів, окиснювати фенол. Концентрація фенолу у воді за дії вільних клітин штаму *Bacillus subtilis* ONU551 у кількості $5,5 \times 10^5$ КУО/мл протягом 5 діб експозиції зменшувалася з 200,0 до $112,0 \pm 5,5$ мг/л (на 44%), сягаючи максимуму на 15 добу – ступінь вилучення фенолу з води складає 99–100%.

Адгезія клітин бактерій *Bacillus subtilis* ONU551 до поверхні природних (цеоліт, торф, активоване вугілля, пісок) і синтетичних (керамічні трубки, волокнисті насадки типу «ВІЯ») носіїв супроводжувалося прискоренням процесу деструкції фенолу в 1,4–2,5 рази порівняно з обробкою води вільними клітинами бактерій. Залишкова концентрація фенолу у воді за її обробки бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на піску і на волокнистій насадці типу «ВІЯ», зменшувалася на 6 добу з 200,0 мг/л до $9,0 \pm 0,25$ мг/л і $6,0 \pm 0,54$ мг/л відповідно (95–96% вилучення фенолу з урахуванням поправки на контроль – носії за відсутності мікроорганізмів). За цей термін експозиції (6 діб) ступінь вилучення фенолу з води бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на активованому вугіллі з урахуванням поправки на контроль (вихідний, необроблений носій), склав лише 72%, не зважаючи на значну сорбцію фенолу протягом перших 24 годин – 62% (з урахуванням поправки на контроль). Концентрація фенолу у воді була на рівні ГДК (0,001 мг/л) за її обробки протягом 11 діб бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на активованому вугіллі, піску, керамічних трубках, волокнистій насадці типу «ВІЯ».

Доведено, що використання бактерій *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованих на найбільш активних природних і синтетичних носіях – мушлях мідій, торфі, піску та волокнистій насадці типу «ВІЯ» – є ефективним способом вилучення фенолу з води.

**Т. В. Гудзенко, И. П. Конуп, О. В. Волювач, Е. Г. Горшкова,
Т. А. Беляева, Н. Н. Чабан**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: 068 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

УДАЛЕНИЕ ФЕНОЛА ИЗ ВОДЫ БАКТЕРИЯМИ *BACILLUS SUBTILIS* ONU551, АДГЕЗИРОВАННЫМИ НА НОСИТЕЛЯХ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ

Реферат

Цель. Исследование эффективности удаления фенола из воды адгезированными на носителях разной природы бактериями *Bacillus subtilis* ONU551.

Методы. Концентрацию фенола в воде определяли экстракционно-фотометрическим методом с использованием 4-аминоантипирина. Достоверность различий между средними значениями остаточной концентрации фенола в



воде определяли по критерию Стьюдента на уровне значимости не менее 95% ($p \leq 0,05$). Обработку данных осуществляли с использованием программы "Microsoft Office Excel 2003". **Результаты.** Экспериментально установлена способность штамма бактерий *B. subtilis* ONU551, выделенного из сточной воды производства фармацевтических препаратов, окислять фенол. Концентрация фенола в воде при ее обработке свободными клетками штамма бактерий *B. subtilis* ONU551 в количестве $5,5 \times 10^5$ КОЕ/мл в течение 5 суток экспозиции уменьшалась с 200,0 до $112,0 \pm 5,5$ мг/л (на 44%), достигая максимума на 15 сутки – степень удаления фенола из воды составила 99–100%. Адгезия бактерий *B. subtilis* ONU551 к поверхности природных (цеолит, торф, активированный уголь, песок), синтетических (керамические трубки, волокнистые насадки типа «ВИЯ») носителей приводила к ускорению процесса удаления фенола из воды в 1,4–2,5 раза, по сравнению с обработкой воды свободными клетками бактерий. Остаточная концентрация фенола в воде при ее обработке бактериями *B. subtilis* ONU551, адгезированными на песке и на волокнистой насадке типа «ВИЯ», уменьшалась на 6 сутки с 200,0 мг/л до $9,0 \pm 0,25$ мг/л и $6,0 \pm 0,54$ мг/л соответственно (на 95–96%) и на 11 сутки находилась на уровне предельно-допустимой концентрации (0,001 мг/л). Степень удаления фенола из воды бактериями *B. subtilis* ONU551, адгезированными на створках мидий, торфе и на цеолите, в конце очистки (11 суток) колебалась в пределах от 87% до 99%; и достигала 100% – при использовании в качестве носителей активированного угля, керамических трубок. **Вывод.** Использование бактерий *B. subtilis* ONU551, адгезированных на природных и синтетических носителях – створках мидий, торфе, песке и волокнистой насадке типа "ВИЯ" обеспечивает 100% удаление фенола из воды.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, адгезия, фенол, окисление, природные и синтетические носители.

**T. V. Gudzenko, I. P. Konup, O. V. Voliuvach, O. G. Gorshkova,
T. O. Belyaeva, M. M. Chaban**

Odesa National I. I. Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine;
tel.: 068 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

REMOVAL OF PHENOL FROM WATER BY *BACILLUS SUBTILIS* ONU551 BACTERIA, ADHERIZED ON THE CARRIERS OF DIFFERENT NATURE

Summary

Aim. Investigation of the efficiency of removal phenol from water by bacteria *Bacillus subtilis* ONU551 adhered on the carriers of different nature. **Methods.** The concentration of phenol in water was determined by extraction-photometric method using 4-aminoantipyrin. The significance of the differences between the mean values of the residual concentration of phenol in water was determined by Student's criterion at a significance level of at least 95% ($p \leq 0.05$). Data processing was performed using the program "Microsoft Office Excel 2003". **Results.** The ability of a *B. subtilis* ONU551 bacterial strain isolated from waste water



produced by pharmaceuticals to oxidize phenol was experimentally established. The concentration of phenol in water during its treatment with free cells of the *B. subtilis* ONU551 bacterial strain in the amount of 5.5×10^5 CFU/ml for 5 days of exposure decreased from 200.0 to 112.0 ± 5.5 mg/l (by 44%), reaching maximum on the 15th day – the degree of phenol removal from water was 99-100%. Adhesion of *B. subtilis* ONU551 bacteria to the surface of natural (zeolite, peat, activated carbon, sand), synthetic (ceramic tubes, fibrous nozzles of the “VIYA” type) of carriers accelerated the removal of phenol from water 1.4–2.5 times, compared to the treatment of water by free bacterial cells. The residual concentration of phenol in water during its treatment with *B. subtilis* ONU551 bacteria adhered on sand and on “VIYA” type fiber packing decreased for 6 days from 200.0 mg/l to 9.0 ± 0.25 mg/l and 6.0 ± 0.54 mg/l, respectively (by 95–96%) and on the 11th day was at the level of maximum permissible concentration (0.001 mg/l). The degree of removal of phenol from water by *B. subtilis* ONU551 bacteria adhered on mussel doors, peat and zeolite at the end of cleaning (11 days) ranged from 87% to 99%; and reached 100% – when used as the carriers of activated carbon, ceramic tubes.

Conclusion. The use of *B. subtilis* ONU551 bacteria adhered on natural and synthetic carriers – mussel shutters, peat, sand and fibrous attachment of “VIYA” type ensures 100% removal of phenol from water.

Key words: *Bacillus subtilis*, adhesion, phenol, aqueous solution, natural and synthetic carriers.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Беспамятков Г. П. Предельно-допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде / Г. П. Беспамятков, Ю. А. Кротов. – Л.: Химия, 1985. – 585 с.
2. Быкова Г. С., Шаталаев И. Ф., Воронин А. В. Фитомасса наяды мелкозубчатой в доочистке фенолсодержащих загрязненных вод фармацевтических производств // Медицинский альманах. – 2014. – №1(31). – С. 102–105.
3. Галкін Б. М., Іваниця В. О., Філіпова Т. О. Механізми біодеградації ксенобіотиків мікроорганізмами. Одеса: вид-во ОНУ імені І. І. Мечникова, 2017. – 104 с.
4. Коробов В. В., Стариков С. Н., Сагитова А. И., Журенко Е. Ю., Жарикова Н. В., Ясаков Т. Р., Маркушева Т. В. Штаммы-деструкторы фенола рода *Bacillus* промышленных экотопов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2017. – №2. – С. 73–77.
5. Лурье Ю. Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. М.: Химия, 1984. – 448 с.
6. Путилина Н. Т., Квитницкая Н. Н., Костовецкий Я. И. Микробный метод обесфеноливания сточных вод. – Киев: Здоровье, 1964. – 87 с.
7. Роль микроорганизмов в функционировании живых систем: фундаментальные проблемы и биоинженерные приложения / Под редакцией В. В. Власова, А. Г. Дегерменджи, Н. А. Колчанова, В. Н. Пармона, В. Е. Репина. Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук. – 2010. – С. 28.
8. Ankur Gupta, Chandrajit Balomajumder. Simultaneous removal of Cr(VI) and phenol from synthetic binary solution using consortium culture of *Bacillus* sp.



and *E. coli* immobilized on tea waste biomass in packed bed reactor // Korean Journal of Chemical Engineering. – 2016. – Vol. 33, № 2. – P. 559–566. DOI: 10.1007/s11814-015-0137-4.

9. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity. – N.Y.: Springer, 2005. – № 2. – 1108 p.

10. *Chris Felshia, S., Aswin Karthick, N., Thilagam, R., Chandralekha, A., Raghavarao, K.S.M.S., Gnanamani, A.* Efficacy of free and encapsulated *Bacillus licheniformis* strain SL10 on degradation of phenol: A comparative study of degradation kinetics // *Journal of Environmental Management*. – 2017. – Vol. 197. – P. 373–383.

11. *Egli K, Fanger U, Alvarez PJ, Siegrist H, van der Meer JR, Zehnder AJ.* Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate // *Arch Microbiol*. – 2001. – Vol. 175(3). – P. 198–207.

12. *Ereقات, Suheir I., Abdelkader, Ahmad A., Nasereddin, Abdelmajeed F., Al-Jawabreh, Amer O., Zaid, Taher M., Letnik, Ilya., Abdeen, Ziad A.* Isolation and characterization of phenol degrading bacterium strain *Bacillus thuringiensis* J20 from olive waste in Palestine // *Journal of Environmental Science & Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. – 2018. – Vol. 53, Issue 1. – P. 39–45. DOI: 10.1080/09593330.2017.1296897

13. *Topalova Yana, Dimkov Raycho, Todorova Yovana, Daskalova Elmira & Perar Petrov.* Biodegradation of Phenol by Immobilized in Peo-Cryogel *Bacillus Laterosporus* BT-271 in Sequencing Batch Biofilter // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2011. – Vol. 25(4). – P. 2613–2619. – DOI: 10.5504/BBEQ.2011.0076

14. *Патент України №129673.* Спосіб мікробіологічної очистки води від фенолу і N-цетилпіридинію бромистого / Іваниця В. О., Гудзенко Т. В., Горшкова О. Г., Волювач О. В., Конуп І. П., Беляєва Т. О., Чабан М., Ракитська С. І. – заявка на патент №u201804337 від 20.04.2018. Опубл. 12.11.2018., Бюл. № 21/2018.

15. *Патент України №97747.* Спосіб аеробного біологічного очищення стічних вод/ Гвоздяк П. І., Глоба Л. І., Саблій Л. А., Капарник А. І., Борисенко О. О., Жукова В. С. Опубл. 12.03.2012, Бюл. №5.

References

1. *Bespanjatkov GP.* Maximum allowable concentrations of chemicals in the environment / *GP. Bespanjatkov, JuA. Krotov.* L.: Himija, 1985:585 [in Russian].

2. *Bykova GS, Shatalaev IF, Voronin AV.* Phytomass of mollusks of fine-toothed in the tertiary treatment of phenol-containing polluted waters of pharmaceutical production. *Medicinskij al'manah.* 2014;1(31):102–105 [in Russian].

3. *Galkin BM, Ivanycja VO, Filipova TO.* Mechanisms of xenobiotic biodegradation by microorganisms. *Odesa: vyd-vo ONU imeni I.I. Mechnykova.* 2017:104 [in Ukrainian].

4. *Korobov VV, Starikov SN, Sagitova AI, Zhurenko EJu, Zharikova NV, Jasakov TR, Markusheva TV.* Strains-destroyers of phenol of the genus *Bacillus* industrial ecotopes. *Izvestija Ufimskogo nauchnogo centra RAN.* 2017; 2:73–77 [in Russian].



5. Lur'e JuJu. Analytical chemistry of industrial wastewater. M.: Himija, 1984:448 [in Russian].
6. Putilina NT, Kvitnickaja HH, Kostoveckij JaI. Microbial method of dephenolization of wastewater. K: Zdorov'ja, 1964:87 [in Russian].
7. The role of microorganisms in the functioning of living systems: fundamental problems and bioengineering applications / Pod redakciej VV. Vlasova, AG. Degermendzhi, NA. Kolchanova, VN. Parmona, VE. Repina. Novosibirsk: Izd-vo Sibirskogo otdelenija Rossijskoj Akademii nauk. 2010:28 [in Russian].
8. Ankur Gupta, Chandrajit Balomajumder. Simultaneous removal of Cr(VI) and phenol from synthetic binary solution using consortium culture of *Bacillus* sp. and *E. coli* immobilized on tea waste biomass in packed bed reactor. Korean Journal of Chemical Engineering. 2016;33(2):559–566. DOI: 10.1007/s11814-015-0137-4
9. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / DJ. Brenner, NR. Krieg, JT. Staley, GM. Garrity. N.Y.: Springer, 2005;2:1108
10. Chris Felshia S, Aswin Karthick N, Thilagam R, Chandralekha A, Raghavarao KSMS, .Gnanamani A. Efficacy of free and encapsulated *Bacillus licheniformis* strain SL10 on degradation of phenol: A comparative study of degradation kinetics. Journal of Environmental Management. 2017;197:373–383
11. Egli K, Fanger U, Alvarez PJ, Siegrist H, van der Meer JR, Zehnder AJ. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. Arch Microbiol. 2001;175(3):198–207
12. Ereqat Suheir I, Abdelkader Ahmad A, Nasereddin, Abedelmajeed F, Al-Jawabreh Amer O, Zaid Taher M, Letnik Ilya, Abdeen Ziad A. Isolation and characterization of phenol degrading bacterium strain *Bacillus thuringiensis* J20 from olive waste in Palestine. Journal of Environmental Science & Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering. 2018;53(1):39–45. DOI: 10.1080/09593330.2017.1296897
13. Topalova Yana, Dimkov Raycho, Todorova Yovana, Daskalova Elmira&Perar Petrov. Biodegradation of Phenol by Immobilized in Peo-Cryogel *Bacillus Laterosporus* BT-271 in Sequencing Batch Biofilter. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2011;25(4):2613–2619. DOI: 10.5504/BBEQ.2011.0076
14. Patent of Ukrai'ny №129673. Method of microbiological purification of water from phenol and N-cetylpyridinium bromide / Ivanycja VO, Gudzenko TV, Gorshkova OG, Voljuvach OV, Konup IP, Bjel'jajeva TO, Chaban M, Rakyts'ka SI. – заявка на патент №u201804337 vid 20.04.2018. Opubl. 12.11.2018., Byul. № 21/2018 [in Ukrainian].
15. Patent of Ukrai'ny №97747. Method of aerobic biological treatment of sewage / Gvozdyak PI, Globa LI, Sablij LA, Kaparnyk AI, Borysenko OO, Zhukova VS. Opubl. 12.03.2012. Byul. № 5 [in Ukrainian].

Стаття надійшла до редакції 18.03.2019 р.



УДК 579.2.606:628

М. М. Чабан, Т. В. ГудзенкоОдеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, 65082, Україна,
e-mail: chaban.nik@onu.edu.ua**ВИЯВЛЕННЯ АНАМОКС БАКТЕРІЙ У СТИЧНИХ ВОДАХ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ВИРОБНИЦТВА**

Анамокс бактерії виявляються в системах очищення стічних вод, а також в інших екологічних нішах, де є анаеробні умови. **Мета.** Виявлення бактерій, відповідальних за АНАМОКС процес у зразках активного мулу та визначення їх таксономічної приналежності. **Методи.** Визначення концентрації амонію, нітриту та нітрату в отриманому зразку проводили з використанням хімічної реакції йонів на реактив Несслера, реактив Грісса та фенолсульфідокислоти [3]. Інтенсивність забарвлення визначали спектрофотометричним методом. Наявність АНАМОКС процесу визначали методом інкубації активного мулу з мінеральним живильним середовищем у анаеробних умовах. Наявність та родову приналежність анамокс бактерій визначали методом FISH з використанням специфічних мічених зондів: універсального Tatra-Atx-0368, а також Fat-Atx-0820 і Fat-Kst-1275. **Результати.** В отриманій пробі визначена концентрація йонів амонію NH_4^+ 0,052 г/л і концентрація нітриту NO_2^- 0,024 г/л. Після інкубації активного мулу у живильному синтетичному середовищі, було встановлене зниження концентрації йонів амонію та нітриту у цьому середовищі. Проведення FISH реакції з використанням трьох мічених зондів: універсальний Tatra-Atx-0368, а також Fat-Atx-0820 і Fat-Kst-1275, та подальша мікроскопія отриманого зразка дозволила встановити наявність колоній анамокс бактерій. **Висновки.** Зниження концентрації йонів амонію на 0,0395 г/л і йонів нітриту на 0,0179 г/л в синтетичному живильному середовищі в анаеробних умовах з виділенням газу свідчить про присутність мікроорганізмів відповідальних за АНАМОКС процес. Результати гібридизації свідчать про наявність в пробі мулу представників родів *Cap. Brocadia* і *Cap. Kueningenia*, яких на об'єм в 50 мкл було 8–10 одиниць мікроколоній та до 3–4 одиниць мікроколоній, представників *Kueningenia stuttgartiensis*.

Ключові слова: стічні води, анамокс бактерії, мул.

Прошло близько 20 років з моменту відкриття мікроорганізмів, які відповідають за АНАМОКС (ANAMMOX) *Anaerobic AMMonium OXidation* процес – анаеробне окиснення амонію з виділенням в навколишнє середовище газоподібного азоту (N_2) та нітрату [8]. З початку дослідження анаеробного окиснення амонію ці мікроорганізми виявляли в системах очищення стічних вод, а в подальшому почали знаходити їх в інших екологічних нішах, де є анаеробні умови [10, 6, 4]. На сьогоднішній день, завдяки молекулярно-ге-



нетичним дослідженням анамокс мікроорганізмів, вдалося виділити їх у п'ять родів, які були віднесені до нового створеного порядку *Candidatus Brocadiales* класу *Planctomycetia* [7, 12, 13]. Дослідження реакції анамокс бактерій до зміни різних фізичних факторів показало їх здатність адаптуватися до змін температури і рН [11, 2].

Метою роботи було проаналізувати зразок стічної води з фармацевтичного виробництва на наявність АНАМОКС процесу та можливу присутність анамокс бактерій, які відповідальні за цей процес.

Матеріали та методи

Матеріалом дослідження був зразок стічних вод і мул фармацевтичного виробництва. Проба зберігалася у при температурі + 3 °С, рН проби 7,6. Усі дослідження проводились у трьох повторях.

Хімічний аналіз концентрації йонів NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- у дослідній пробі. Для визначення концентрації йонів, які є ключовими для циклу Нітрогену (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-), пробу попередньо фільтрували за допомогою помпового насоса через фільтр з діаметром пор 0,3 мкм, розділяли пробу на три частини, в кожену частину вносили відповідний реактив до визначення конкретних йонів (реактив Несслера, реактив Грісса та фенолсульфідокислоту) [3]. Для визначення оптичної щільності використовували спектрофотометр Biorad Smart spec Plus з довжиною хвилі (λ) для реакції на амоній 425 нм та 530 нм для реакції на нітрит.

Для визначення наявності АНАМОКС процесу в отриманій пробі використовували живильне мінеральне середовище, де концентрація солі амонію і нітриту була на рівні отриманих даних хімічного аналізу дослідної проби. Склад живильного середовища (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,0514; NaNO_2 – 0,024; NaNO_3 – 0,010; KHCO_3 – 1,248; NaH_2PO_4 – 0,05; CaCl_2 – 0,3; MgSO_4 – 0,2; FeSO_4 – 0,006; EDTA – 0,006 [9]. Хімічну колбу 500 мл заповнювали 350 мл живильного мінерального середовища, і потім у неї завантажували 70 мл рідкого осаду мулу з проби та закривали пробкою з отвором для виведення газу. Далі отриману суспензію продували протягом 20 хвилин газом Ar / CO_2 (95% / 4,5%) для видалення розчиненого кисню та отримання анаеробних умов. Колбу поміщали в термостат при температурі 32 °С до появи в ній бульбашок газу [9, 1]. рН утримували на рівні 7,6, використовуючи 1М NaOH і 1% H_2SO_4 з підтриманням та відновленням анаеробних умов.

Для візуальної детекції наявності анамокс бактерій застосовували метод FISH мікроскопії з використанням специфічних мічених зондів [5] з деякими модифікаціями в методиці гібридизації мічених зондів (табл.). Зокрема, для збільшення якості гібридизації флуоресцентних зондів з клітинами-мішенями, використовували пробірки типу епендорф об'ємом 1,5 мл як мініатюрну закриту камеру з вологими умовами, необхідними для процесу гібридизації. Фіксацію клітин проводили в 2% параформальдегіді на льоду при + 3 °С протягом 2 годин. Промивання зразка здійснювали два рази відповідним буфером 15 хвилин при температурі 48 °С (табл.). Для проведення гібридизації використовували термостат для пробірок типу епендорф Віокот (Термо 48). Для аналізу результатів використовували флуоресцентний мікроскоп Zeiss з вико-



ристанням фотокамери Sony RX-100 IV для фіксації результатів.

Таблиця

Флуоресцентні зонди для FISH мікроскопії

Table

Fluorescent probe for FISH microscopy

Мічений зонд	Специфічність	Послідовність 5' – 3'	Formamid/ NaCl, mM
Tamra-Amx-0368	Усі анамокс бактерії	CCTTTCGGGCATTGCGAA	15/338
Fam-Amx-0820	<i>Can. Brocadia</i> і <i>Can. Kuenenia</i>	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	40/56
Fam-Kst-1275	<i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	TCGGCTTTATAGGTTTCGCA	25/159

Результати досліджень та їх обговорення

В отриманій пробі з фармацевтичного виробництва концентрація йонів амонію NH_4^+ становила 0,052 г/л, а нітриту NO_2^- 0,024 г/л. У подальшому отримані значення концентрацій цих йонів були використані для приготування синтетичного живильного середовища для виявлення АНАМОКС процесу.

Використовували синтетичне живильне середовища з концентраціями солі амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,052 г/л та нітриту (NaNO_2) 0,024 г/л, такими які були визначені у пробі. В процесі інкубації проби мулу в синтетичному середовищі на другу добу відзначалося виділення дрібних бульбашок газу біля часток мулу, а сам мул під дією бульбашок піднімався до поверхні рідини.

Після закінчення активного процесу виділення дрібних бульбашок газу (4–5 доба) живильне мінеральне середовище аналізували на залишкову концентрацію йонів амонію і нітриту. В результаті хімічного аналізу встановлено, що концентрація йонів амонію знизилася з $0,052 \pm 0,5$ г/л до $0,0125 \pm 0,7$ г/л, концентрація йонів нітриту – з $0,024 \pm 0,6$ г/л до $0,0061 \pm 0,75$ г/л. Зниження концентрації йонів амонію і нітриту в синтетичному живильному середовищі в анаеробних умовах з виділенням газу свідчить про присутність мікроорганізмів, відповідальних за АНАМОКС процес.

Для подальшого візуального дослідження бактерій, відповідальних за АНАМОКС процес, і підтвердження їх наявності проведена FISH реакція і мікроскопія отриманих зразків. Для аналізу використовували мул з основної ємності, для встановлення наявності бактерій, відповідальних за АНАМОКС процес. В реакції були використані три мічених зонди (табл.). Спочатку аналізували наявність всіх анамокс бактерій в пробі, використовуючи універсальний мічений зонд Tamra-Amx-0368. На рисунку 1 представлені результати гібридизації, де відмічено мікроколонії анамокс бактерій.

Для гібридизації використовували зразок об'ємом 50–60 мкл. Аналіз даного об'єму проби показав наявність незначної кількості мікроколоній анамокс бактерій. Загальна кількість мікроколоній на об'єм гібридизації складала 10–12 одиниць.



Далі пробу аналізували з використанням мічених зондів Fam-Amx-0820 і Fam-Kst-1275 (табл.). На рисунку 2 показано результати гібридизації з міченим зондом Amx-0820, а на рисунку 3 – з міченим зондом Kst-1275.

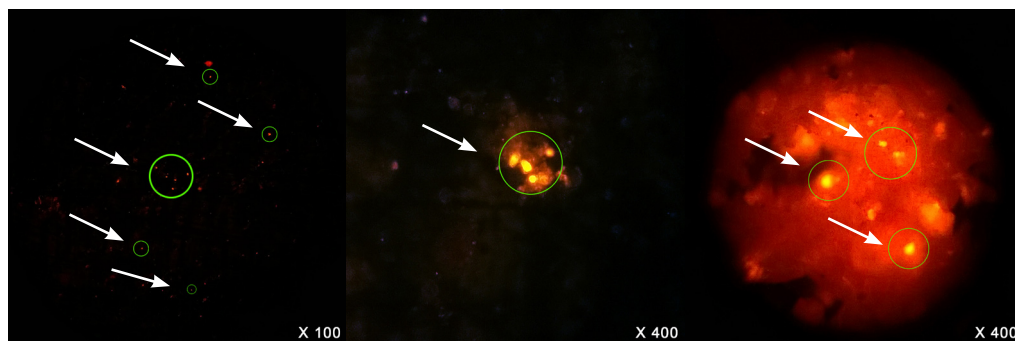


Рис. 1. Колонії анамокс мікроорганізмів при збільшенні в 100 і 400 разів: гібридизація зонду Amx-0368 з анамокс бактеріями

Fig. 1. Colonies of anammox microorganisms with increase of 100 and 400 times: hybridization of probe Amx-0368 with anammox bacteria

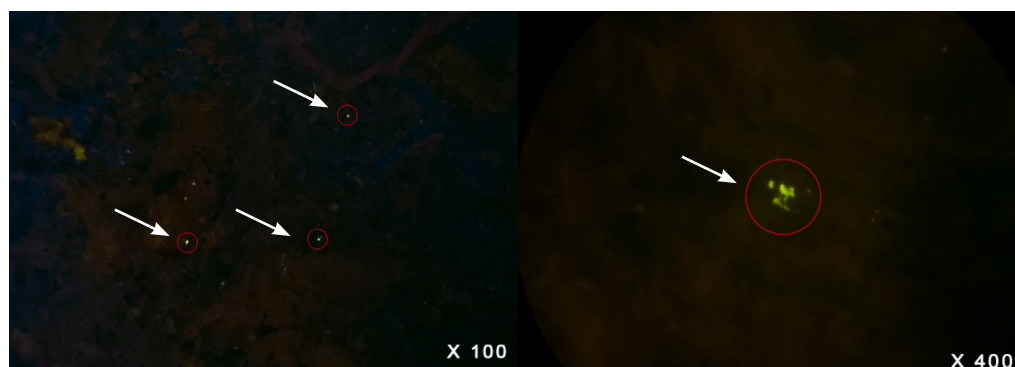


Рис. 2. Колонії анамокс бактерії при збільшенні в 100 і 400 разів: гібридизація зонду Amx-0820 з анамокс бактеріями

Fig. 2. Colonies of anammox bacteria with increase of 100 and 400 times: hybridization of probe Amx-0820 with anammox bacteria

Результати гібридизації, відображені на знімках, свідчать про наявність в пробі мулу та води представників родів *Can. Brocadia* і *Can. Kuenenia* (рис. 2) та представників *Kuenenia stuttgartiensis* (рис. 3). При візуальному дослідженні результатів гібридизації встановлено від 8 до 10 одиниць мікроколоній представників *Can. Brocadia* і *Can. Kuenenia*, та присутність їх у меншій кількості, від 3 до 4 одиниць мікроколоній, представників *Kuenenia stuttgartiensis* на об'єм зразку в 50 мкл.

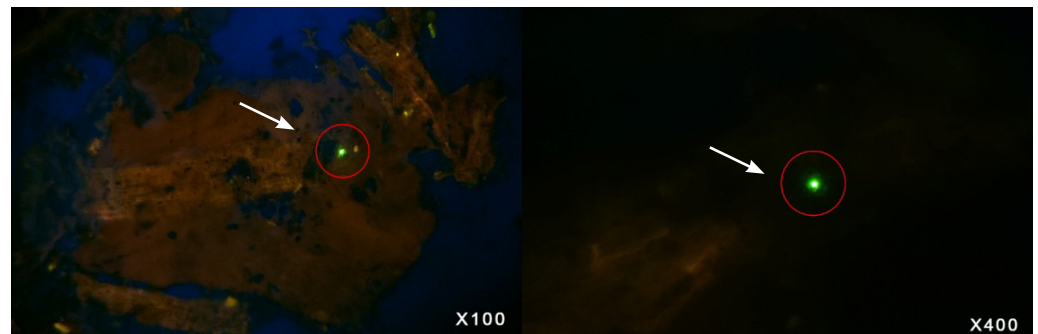


Рис. 3. Колонії анамокс бактерії при збільшенні в 100 і 400 разів: гібридизація зонду Kst-1275 з анамокс бактеріями

Fig. 3. Colonies of anammox bacteria with increase of 100 and 400 times: hybridization of probe Kst-1275 with anammox bacteria

У результаті досліджень було підтверджено наявність АНАМОКС процесу у мулі стічних вод фармацевтичного виробництва, та бактерій, які беруть у цьому участь. Також встановлено, що кількість мікроколоній представників *K. Stuttgartiensis* приблизно у два рази менша за кількість мікроколоній *Can. Brocadia* і *Can. Kuenenia* у проаналізованих полях зору. Представників родів *Can. Brocadia* і *Can. Kuenenia* на об'єм в 50 мкл було 8–10 одиниць мікроколоній. Представників *Kuenenia stuttgartiensis* в об'ємі 50 мкл було 3–4 одиниць мікроколоній. Що може свідчити про адаптації конкретних представників анамокс бактерій до певних умов у цих стічних водах.

Н. Н. Чабан, Т. В. Гудзенко

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

ОБНАРУЖЕНИЕ АНАМОКС БАКТЕРИЙ В СТОЧНЫХ ВОДАХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Реферат

Анаммокс бактерии обнаруживаются в системах очистки сточных вод, а также и в других экологических нишах, где есть анаэробные условия. **Цель.** В образцах активного ила установить присутствие бактерий, ответственных за АНАММОКС процесс, и их родовую принадлежность. **Методы.** Определение концентрации аммония, нитрита и нитрата в полученной пробе проводили с использованием химической реакции ионов на реактив Несслера, реактив Грисса и фенолсульфидокислоту [3]. Интенсивность окрашивания определяли спектрофотометрическим методом. Наличие АНАММОКС процесса определяли методом инкубации активного ила в питательной минеральной среде в анаэробных условиях. Наличие и родовую принадлежность анаммокс бактерий определяли методом FISH (fluorescence hybridization)



in situ) с использованием специфических меченых зондов: универсального Tamra-Amx-0368, а так же Fam-Amx-0820 и Fam-Kst-1275. **Результаты.** В полученной пробе определена концентрация ионов аммония NH_4^+ 0,052 г/л и концентрация нитрита NO_2^- 0,024 г/л. После инкубации активного ила в питательной минеральной среде, было установлено снижение концентрации ионов аммония и нитрита в этой среде. Проведение FISH реакции с использованием трёх меченых зондов: универсального Tamra-Amx-0368, а также Fam-Amx-0820 и Fam-Kst-1275 и последующая микроскопия полученного образца позволила установить наличие колоний анаммокс бактерий. **Выводы.** Снижение концентрации ионов аммония на 0,0395 г/л и ионов нитрита на 0,0179 г/л в синтетической питательной среде в анаэробных условиях с выделением газа свидетельствует о присутствии микроорганизмов ответственных за АНАММОКС процесс. Результаты гибридизации свидетельствуют о наличии в пробе ила представителей родов *Can.* *Brocadia* и *Can.* *Kuenenia*, которых на объём в 50 мкл было 8–10 единиц микроколоний и до 3–4 единиц микроколоний, представителей *Kuenenia stuttgartiensis*.

Ключевые слова: сточные воды, анаммокс бактерии, ил.

M. M. Chaban, T. V. Gudzenko

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

ANAMMOX BACTERIA DETERMINATION IN THE PHARMACEUTICAL PRODUCTION WASTEWATER

Summary

Anammox bacteria are found in sewage treatment systems, as well as in the other ecological niches, where there are anaerobic conditions. The **aim** of the study was to establish the ANAMMOX bacteria (**A**naerobic **AM**monium **OX**idation) presence and their systematic affiliation in active sludge samples. **Methods.** The ammonium, nitrite and nitrate concentration determination in the samples was obtained using spectrophotometric reactions. The ANAMMOX process presence was determined by the active sludge incubation method with mineral nutrient medium under anaerobic conditions. The anammox bacteria presence and genus affiliation were determined by FISH (fluorescence hybridization *in situ*) technique using specific tagged primers: the universal Tamra-Amx-0368, and also Fam-Amx-0820 and Fam-Kst-1275. **Results.** For the anammox bacteria synthetic nutrient medium preparation there were determined the ammonium and nitrite ions concentration in the experimental test. The nutrient mineral medium was analyzed for the residual ammonium and nitrite ions concentration after cultivation. For further visual examination of the ANAMMOX bacteria, FISH reaction and the samples microscopy there were performed. Three tagged primers were used in the reaction: the universal Tamra-Amx-0368, and also Fam-Amx-0820 and Fam-Kst-1275. **Conclusions.** The decrease of the concentration of ammonium ions by 0,0395 g / l and ions nitrites at 0.0179 g / l in a synthetic nutrient medium in anaerobic conditions with gas release indicates the presence of microorganisms responsible for the ANAMMOX process. The hybridization results indicated *Can.*



Brocadia and Can. Kuenenia presence in the sludge and water sample, in the range of 8 to 10 microcolonial units per 50 µl, as well as Kuenenia stuttgartiensis, but in smaller number, 3 to 4, of microcolonial units.

Key words: wastewater, anammox bacteria, sludge.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гвоздяк П. І., Салура О. В. Простий метод виявлення та оцінки інтенсивності анаеробних процесів, що супроводжуються виділенням газів // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – № 8. – С. 53–57.
2. Мальований А. М., Ятчишин Й. Й., Мальований М. С. Оцінка факторів, що впливають на специфічну активність процесу анамокс // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». – 2010. – № 677. – С. 285–289.
3. Новиков Ю. В., Ласточкина К. О. Методы исследования качества воды водоёмов. – 2-е изд. – М.: Медицина, 1990. – 236 с.
4. Шандрович В. Т., Мальований М. С., Мальований А. М. Застосування АНАММОХ-процесу для очищення стічних вод від сполук азоту // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». – 2014. – № 787. – С. 352–357.
5. Baeten J. E., Batstone D. J. Modelling anaerobic, aerobic and partial nitrification-anammox granular sludge reactors – A review. *Water Research*. 2018;(149):322–341.
6. Bagchi S. Metatranscriptomics reveals the molecular mechanism of large granule formation in granular anammox reactor. *Scientific Reports*. 2016;(6):28327, available at: <https://www.nature.com/articles/srep28327>
7. Chen H., Jin R. Summary of the preservation techniques and the evolution of the anammox bacteria characteristics during preservation. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 2017;101(11):4349–4362.
8. Kartal B. Anammox Biochemistry: a Tale of Heme c Proteins – A review. *Cell Press*. 2016;(41):998–1011 Doi: 10.1016/j.tibs.2016.08.015
9. Kocamemi B. A., Dityapak D. Anammox start-up strategies: the use of local mixed activated sludge seed versus Anammoxseed. *Water Science & Technology*. 2018;78(9):1901–1915.
10. Sonthiphand P. Biogeography of anaerobic ammonia oxidizing (anammox) bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2014;(5):399. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00399
11. Zhang Z., Liu S. Hot topics and application trends of the anammox biotechnology: a review by bibliometric analysis. *SpringerPlus*. 2014;(3):220. Doi: 10.1186/2193-1801-3-220
12. Zhang L., Okabe S. Rapid cultivation of free-living planktonic anammox cells. *Water Research*. 2017;(127):204–210.
13. Zhu G., Wang S. Resuscitation of anammox bacteria after >10,000 years of dormancy. *ISME journal*. 2018. doi: 10.1038/s41396-018-0316-5



References

1. Gvozdyak PI, Sapura OV. Simple method of detection and intensity estimation of anaerobic processes accompanied by gas release. *Microbiology and Biotechnology*. 2009;4(8):53–57 (In Ukrainian).
2. Malevannyj AM, Yatchyshyn JJ, Malevannyj MS. Estimation of factors influencing the specific activity of the anammox process. *Bulletin of the National University "Lviv Polytechnic"*. 2010;(677): 285 – 289 (In Ukrainian).
3. Novikov YV, Lastochkina CO. *Methods of water quality study of reservoirs*. Moscow: Medicine. 1990. 236 (In Russian).
4. Shandrovich VT, Malevannyj MS, Malevannyj AM. Application of the ANAMMOX process for purifying sewage from nitrogen compounds. *Bulletin of the National University "Lviv Polytechnic"*. 2014;(787): 352 – 357 (In Ukrainian).
5. Baeten JE., Batstone DJ. Modelling anaerobic, aerobic and partial nitrification-anammox granular sludge reactors – A review. *Water Research*. 2018;(149):322–341.
6. Bagchi S. Metatranscriptomics reveals the molecular mechanism of large granule formation in granular anammox reactor. *Scientific Reports*. 2016;(6):28327, available at: <https://www.nature.com/articles/srep28327>
7. Chen H., Jin R. Summary of the preservation techniques and the evolution of the anammox bacteria characteristics during preservation. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 2017;101(11):4349–4362.
8. Kartal B. Anammox Biochemistry: a Tale of Heme c Proteins – A review. *Cell Press*. 2016;(41):998–1011 Doi: 10.1016/j.tibs.2016.08.015
9. Kocamemi BA., Dityapak D. Anammox start-up strategies: the use of local mixed activated sludge seed versus Anammoxseed. *Water Science & Technology*. 2018;78(9):1901–1915.
10. Sonthiphand P. Biogeography of anaerobic ammonia oxidizing (anammox) bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2014;(5):399. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00399
11. Zhang Z., Liu S. Hot topics and application trends of the anammox biotechnology: a review by bibliometric analysis. *SpringerPlus*. 2014;(3):220. Doi: 10.1186/2193-1801-3-220
12. Zhang L., Okabe S. Rapid cultivation of free-living planktonic anammox cells. *Water Research*. 2017;(127):204–210.
13. Zhu G., Wang S. Resuscitation of anammox bacteria after >10,000 years of dormancy. *ISME journal*. 2018. doi: 10.1038/s41396-018-0316-5

Стаття надійшла до редакції 28.01.2019 р.



УДК 579.695

Н. Ю. Васильєва, Л. І. Слюсаренко, Т. В. Васильєва

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

АКУМУЛЯЦІЯ Cu(II) МОРСЬКИМИ НЕЙТРОФІЛЬНИМИ ТІОНОВИМИ БАКТЕРІЯМИ

Мета: визначити здатність нейтрофільних тіонових бактерій вилучати йони Cu(II) з водних розчинів. **Методи.** Об'єктом дослідження була здатність морських тіонових бактерій, ізольованих з води Чорного моря в районі Одеської затоки до вилучення міді з водного розчину. Для дослідження метал-аккумуляційної активності тіонових бактерій, відбирали штами, які були резистентними до міді на рівні 0,01–0,02 М. Початкова концентрація Cu(II) у водному розчині становила 1 мМ. Термін культивування мікроорганізмів у водному розчині, що містить мідь становив 10 діб. Залишковий вміст Cu(II) у водному розчині визначали атомно-абсорбційним методом на приладах ААС-1 (Німеччина) і С-115ПК Selmi (Україна) при довжині хвилі 324,7 нм для Cu. Достовірність отриманих результатів оцінювали за критерієм Стьюдента з вірогідністю $p < 0,05$. **Результати.** Встановлено, що тіонові бактерії, ізольовані з води Чорного моря, здатні до акумуляції міді з водних розчинів. Cu-аккумуляційна активність залежить від тривалості взаємодії між мікроорганізми і розчином. Максимальний рівень вилучення Cu(II) – 89,24% з водного розчину реєстрували на 10 добу культивування при використанні штаму *Thiobacillus* sp. DKZ_4. На сьому добу культивування вилучення Cu(II) з водного розчину при використанні штаму *Thiobacillus* sp. DKZ_2 досягало 85,25%. Показано, що рівень резистентності до міді, який був визначений раніше, не корелює зі здатністю бактерій акумулювати мідь. **Висновки.** Нейтрофільні тіонові бактерії, ізольовані з води Чорного моря, здатні до акумуляції Cu(II) з водного розчину в межах від 22,83% до 89,24% і тому вони можуть бути перспективними для розробки біосорбційної технології. Здатність до Cu-аккумуляційної активності залежить від штаму та не залежить від МІК.

Ключові слова: нейтрофільні тіонові бактерії, очищення води, Cu(II).

Сучасні біосорбційні технології спрямовані на очищення навколишнього середовища від іонів важких металів і здебільшого базуються на здатності мікроорганізмів зв'язувати, видаляти і накопичувати метали. Причому кожне перетворення включає в себе, безліч різних процесів (сорбції, десорбції, комплексоутворення, реакції окиснення-відновлення і біоаккумуляції). В подібних технологіях застосовується біомаса, що містить мертві або живі, активно метаболізувальні мікроорганізми та широкий діапазон тимчасових змінних навколишнього середовища і біологічних факторів (рН, Eh, розчи-



нений O_2 , органічні та неорганічні ліганди, катіони інших металів і мікробна активність та тощо). При використанні живих мікроорганізмів може здійснюватися активна і пасивна сорбція, тобто акумуляція і біосорбція. Акумуляція має складніший механізм, бо в цьому випадку задіяні метаболічні процеси, які підтримують життєзабезпечення мікроорганізму і часто безпосередньо пов'язані зі специфічними механізмами резистентності. До таких специфічних механізмів відносять внутрішньоклітинне і позаклітинне секвестрування, властиве багатьом мікроорганізмам і найбільш докладно вивчене на прикладі бактерій родів *Pseudomonas*, *Rhizobium* та *Escherichia*, *Bacillus* [6, 14, 9].

Проведене дослідження безпосередньо стосується проблеми, яка пов'язана з розробкою нових біотехнологічних підходів відносно завдання очищення стічних вод від важких металів. Мотивацією для відбору саме міді і нейтрофільних тіонових бактерій слугувало декілька причин. По-перше, серед безлічі важких металів, що знаходяться в навколишньому середовищі мідь є одним з найбільш цікавих металів бо мідь відноситься до речовин з високим ступенем токсичності, відповідно до шкали Ейхгорна, яка відображає взаємодії металів з азотистими гетероциклічними основами ДНК ($Cu^{2+} > Cd^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$), тобто є гостро токсичною для більшості прісноводних і морських мікроорганізмів, безхребетних, а також для водних рослин [5, 8].

По-друге, у сучасній біотехнології найчастіше використовуються ацидофільні тіонові бактерії, які беруть участь у біовилуговуванні металів з відвалів різного походження. Практичне використання нейтрофільних тіонових бактерій практично не зустрічається. Однак, на нашу думку є можливість використовувати саме нейтрофільні форми тіонових бактерій у біотехнології особливо в галузі очистки вод від важких металів.

По-третє, бактерії, які виділені з морського середовища, пристосовані до несприятливих умов, і, як наслідок, мають комплекс специфічних адаптацій, в тому числі, і резистентність до дії важких металів [7].

Крім того, питання розробки нових технологій і створення нових мікробних біопрепаратів для вирішення проблем забруднення навколишнього середовища, є особливо важливим у зв'язку з посиленням законів з охорони навколишнього середовища. Вимоги, що пред'являються до якості води, спонукають до вдосконалення, а також розробки нових, більш ефективних методів очищення стічних вод від металів. Біологічні методи у порівнянні з існуючими хімічними і фізичними методами очищення знаходять все більше застосування для вилучення металів з промислових, а також побутових стічних вод бо характеризуються достатньою простотою і ефективністю [7].

Тому метою дослідження було визначити здатність нейтрофільних тіонових бактерій вилучати йони Cu(II) з водних розчинів.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були морські тіонові бактерії, ізольовані з води Чорного моря в районі Одеської затоки. Проби морської води відбирали з двох територіальних зон: Біологічна станція ОНУ імені І. І. Мечникова та району Дачі Ковалевського. На кожній локації окремо були відібрані дві точки: мор-



ська вода (глибина забору проби 10–15 см від поверхні), та вода з зони заплеску – супралітораль (1,5 м від кінця морської хвилі та на глибині 60–70 см.).

Попереднє виділення та культивування ізолюваних штамів тіонових бактерій здійснювали на агаризованому середовищі Бейеринка (г/л), яке вважається універсальним для виділення нейтрофільних тіонових бактерій [3]: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ – 5,0 г; NaHCO_3 – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,2; MgCl_2 – 0,1; NH_4Cl_2 – 0,1; вода дистильована – 1,0 л; рН 7,0.

Середовище готували на морській воді. Наявність росту спостерігали протягом 7–14 діб.

Визначення приналежності ізолюваних мікроорганізмів до тіонових бактерій здійснювали, орієнтуючись на морфологічні, культуральні та біохімічні ознаки, наведені у визначнику Бергі. Морфологію клітин вивчали за допомогою світлового мікроскопу у різний термін культивування (1, 3, 7 та 10 діб); визначали форму клітин, рухливість, відношення клітин бактерій до забарвлення по Граму.

Для дослідження метал-акумуляовальної активності тіонових бактерій відбирали штами, які були резистентними до міді на рівні 0,01–0,02 М (табл. 1).

Таблиця 1

Райони виділення штамів тіонових бактерій та показники мінімальних інгібувальних концентрацій для них (МІК)

Table 1

The isolation place and index of minimum inhibitory concentration (MIC) of sulfur-oxidizing bacteria

Місце виділення	Назва штаму	МІК (мінімальна інгібувальна концентрація) міді
Зона заплеску в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_1	0,01 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_3	0,02 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_5	0,02 М
Зона заплеску в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_2	0,02 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_3	0,02 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_4	0,02 М
Морська вода в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_4	0,01 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_5	0,02 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_6	0,02 М
Морська вода в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_8	0,01 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_2	0,01 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_3	0,02 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_4	0,01 М



Початковим розчином для дослідів слугувало рідке середовище Бейеринка з додаванням 0,02% дріжджового екстракту (створення міксотрофних умов) і 1 мМ $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Для кожного окремого штаму використовували флакон об'ємом 250 мл, в який додавали 100 мл початкового розчину і один мл бактеріальної суспензії (концентрація клітин становила 1×10^8 КУО/мл).

За контроль слугувало рідке середовище Бейеринка з додаванням 0,02% дріжджового екстракту, 1,0 мМ $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ без додавання мікроорганізмів. Дослідні та контрольні варіанти витримували в термостаті при температурі $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ протягом десяти діб. Дослід проводили в трьох повторях.

Оцінку метал-акумулювальної активності тіонових бактерій здійснювали за ступенем очищення розчину води від іонів міді:

$$\alpha = [(C_0 - C)/C_0] \times 100\%,$$

де C_0 і C – концентрації політанта до та після обробки [1, 2].

Аналіз розчинів на залишковий вміст міді здійснювали із застосуванням атомно-абсорбційної спектроскопії на приладах ААС-1 (Німеччина) і С-115ПК Selmi (Україна) при довжині хвилі 324,7 нм для Cu [1].

Для того, щоб визначити залишковий вміст міді у розчині, бактеріальні клітини відділяли осаджуванням шляхом центрифугування при 10 000 об/хв протягом 5 хв.

Достовірність отриманих результатів оцінювали за критерієм Стьюдента з вірогідністю $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

При дослідженні резистентності тіонових бактерій до міді помітили, що деякі штами при високих концентраціях формують колонії насиченого синього кольору (рис. 1), що може бути показником здатності до акумуляції іонів міді клітинами бактерій.

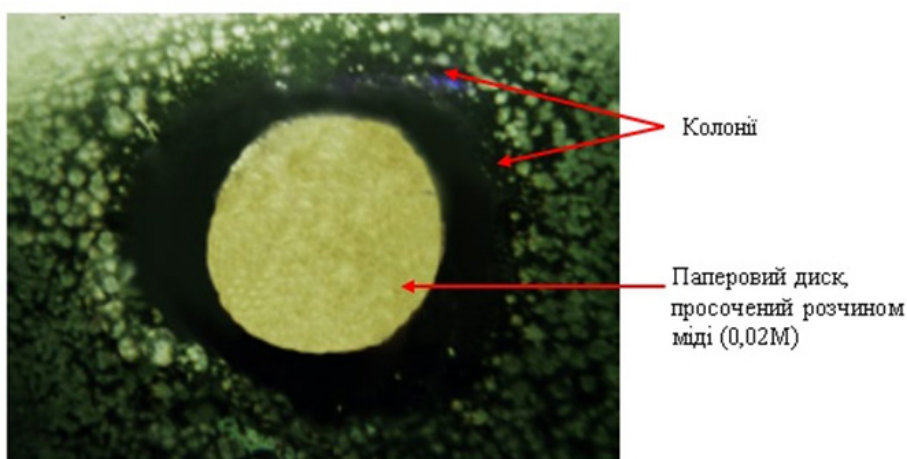


Рис. 1. Морфологічні особливості колоній тіонових бактерій за присутності іонів міді ($\times 4$)

Fig. 1. Morphological features of some colonies of sulfur-oxidizing bacteria in presence of copper ions ($\times 4$)

Слід відмітити, що мідь відноситься до металів так названої "комбінованої дії". Йон міді (II) є високопотенційним металом-окиснювачем, який також здатний до заміщення металів в активних центрах ензимів [4], що служать кофактором для багатьох ензимів, включаючи термінальні оксидази, монооксигенази, диоксигенази і супероксиддисмутази. Однак, надмірна концентрація йонів міді спричиняє токсичний вплив на живі організми [1, 6, 4, 14, 16].

При проведенні дослідження було показано, що на першу добу метал-акумулювальну активність штамів тіонових бактерій, ізольованих з морської води і зони заплеску майже не спостерігали (табл. 2). Штами *Thiobacillus sp.* BSZ_1, *Thiobacillus sp.* BSZ_3, *Thiobacillus sp.* BSZ_5 акумулювали з розчину від 10,56 до 17,95% йонів міді (табл. 2). Для штамів, ізольованих з зони заплеску біля Дачі Ковалевського (*Thiobacillus sp.* DKZ_2, *Thiobacillus sp.* DKZ_3), показник акумуляції міді не відрізнявся. Метал-акумулювальна активність штаму *Thiobacillus sp.* DKZ_4 на першу добу була практично нульовою (табл. 2).

Найбільша здатність вилучати мідь (33,97 і 44,71%) показана для штамів *Thiobacillus sp.* BSS_4 і *Thiobacillus sp.* BSS_5, які були ізольовані з морської води в районі Біологічної станції ОНУ (табл. 2).

Таблиця 2

Ступінь вилучення $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ при початковій концентрації 1,0 мМ на першу добу дослідження

Table 2

Degree of biological purification of aqueous solution from $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ with initial concentration of 1.0 mM for the first day of the study

Місце виділення	Назва штаму	МІК міді	Акумуляція міді	
			Абсолютне значення (мг/дм ³)	% вилучення
Зона заплеску в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_1	0,01 М	51,75±1,20	17,95
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_3	0,02 М	54,26±1,25	13,97
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_5	0,02 М	56,41±3,51	10,56
Зона заплеску в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_2	0,02 М	56,52±1,31	10,39
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_3	0,02 М	53,70±1,24	14,87
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_4	0,02 М	62,97±1,46	0,16
Морська вода в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_4	0,01 М	41,65±0,96	33,97
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_5	0,02 М	34,87±0,81	44,71
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_6	0,02 М	56,92±1,32	9,75
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_8	0,01 М	54,01±1,25	14,36
Морська вода в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_2	0,01 М	58,34±1,35	7,50
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_3	0,02 М	57,89±1,34	8,22
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_4	0,01 М	51,75±1,33	8,69



На сьому добу спостереження було відмічено суттєве зменшення кількості міді у розчині. Найбільша метал-акумулювальна активність відзначена для штамів з зони заплеску в районі Дачі Ковалевського і морської води біля Біологічної станції ОНУ. Ступінь вилучення міді з розчину досягала 75,19–85,25% для штамів *Thiobacillus sp.* DKZ_2, *Thiobacillus sp.* DKZ_3, *Thiobacillus sp.* DKZ_4 і 63,48–77,89% для штамів *Thiobacillus sp.* BSS_5, *Thiobacillus sp.* BSS_6, *Thiobacillus sp.* BSS_8 (табл. 3).

Таблиця 3

Ступінь біологічного очищення водного розчину від $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ при початковій концентрації 1,0 мМ на сьому добу дослідження

Table 3

Degree of biological purification of aqueous solution from $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ with initial concentration of 1.0 mM on the seventh day of the study

Місце виділення	Назва штаму	МІК міді	Акумуляція міді	
			Абсолютне значення (мг/дм ³)	% вилучення
Зона заплеску в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_1	0,01 М	46,63±1,08	26,56
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_3	0,02 М	41,6±0,96	34,49
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_5	0,02 М	38,14±0,88	39,94
Зона заплеску в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_2	0,02 М	9,37±0,22	85,25
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_3	0,02 М	14,01±0,32	77,93
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_4	0,02 М	15,75±0,36	75,19
Морська вода в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_4	0,01 М	32,66±0,75	48,57
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_5	0,02 М	23,22±0,54	63,43
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_6	0,02 М	23,06±0,53	63,68
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_8	0,01 М	14,03±0,32	77,89
Морська вода в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_2	0,01 М	41,42±0,96	34,77
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_3	0,02 М	49,01±1,13	22,83
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_4	0,01 М	39,96±0,92	37,07

На десяту добу спостереження майже в усіх дослідах спостерігали значне зниження залишкового вмісту йонів міді у розчині. Максимальний рівень вилучення міді досягав 89,24% (штам *Thiobacillus sp.* DKZ_4). Штами *Thiobacillus sp.* BSS_4, *Thiobacillus sp.* BSS_5 і *Thiobacillus sp.* BSS_6 також демонстрували рівень очищення розчину від йонів міді на рівні 85,6–88,42% (табл. 4). Саме ці штами, ізолювані з морської води в районі Біологічної станції ОНУ, демонстрували максимальну активність з самого початку експерименту (табл. 2).

Високий ступінь вилучення міді з розчину реєстрували для штамів *Thiobacillus sp.* DKS_2 і *Thiobacillus sp.* DKS_3, ізолюваних з морської води біля Дачі Ковалевського (87,27–88,97%) (табл. 4).



Таблиця 4

Ступінь вилучення $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ при початковій концентрації
1,0 мМ на десяту добу дослідження

Table 4

Degree of biological purification of aqueous solution from $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ with initial
concentration of 1.0 mM on the tenth day of the study

Місце виділення	Назва штаму	МІК міді	Акумуляція міді	
			Абсолютне значення (мг/дм ³)	% вилучення
Зона заплеску в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_1	0,01 М	22,29±0,53	6,17
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_3	0,02 М	24,01±0,57	61,41
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_5	0,02 М	9,61±0,21	84,55
Зона заплеску в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_2	0,02 М	11,35±0,26	82,00
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_3	0,02 М	11,59±0,27	81,62
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_4	0,02 М	6,78±0,16	89,24
Морська вода в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_4	0,01 М	8,95±0,21	85,60
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_5	0,02 М	8,02±0,19	87,12
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_6	0,02 М	7,17±0,17	88,42
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_8	0,01 М	6,89±0,16	89,07
Морська вода в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_2	0,01 М	46,43±1,07	26,37
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_3	0,02 М	6,95±0,16	88,97
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_4	0,01 М	8,03±0,19	87,27

Узагальнені результати дослідження наведено на рисунку 2, з якого наочно видно, що найбільш перспективним штамом є *Thiobacillus sp.* DKZ_4, який демонстрував максимальний рівень вилучення міді – 89,24% (табл. 4).

Також, досить цікавим для розробки нової біосорбційної біотехнології є штам *Thiobacillus sp.* DKZ_2, для якого зареєстрували 85,25% вилучення йонів міді на сьому добу (табл. 3, рис. 2).

Отримані під час проведення дослідження мікроскопічні препарати (рис. 3), наочно демонструють, що форма клітин під дією міді змінюється. Якщо спочатку мікроорганізми виглядали як звичайні грам-негативні палички, то наприкінці досліду вони збільшуються, набувають округлої форми і більшість з них стають забарвленими в синій, блакитний або зеленої колір (рис. 3).

Як відомо, системами гомеостазу транспорту металів у бактеріальній клітині є ефлюкс-системи. Резистентність до міді також залежить від подібної системи транспорту, яка регулюється вмістом йонів міді, її позаклітинної біодоступності і внутрішньоклітинної потреби в металі. Найбільш дослідженими шляхами у бактерій, що відповідають за стійкість до Cu^{2+} , є активний відтік йонів цього металу з цитоплазми в периплазму, що регулюється АТФазами, системою відтоку Cus і шаперонами міді [10, 11, 12, 15, 17].



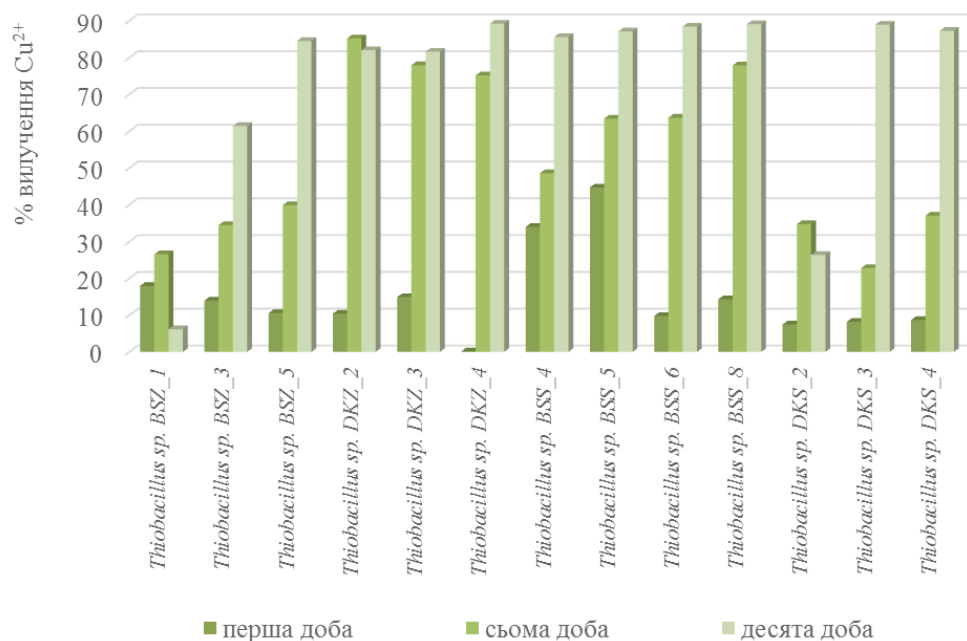


Рис. 2. Метал-акумулювальна активність тіонових бактерій Чорного моря за ступенем очищення водного розчину від $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ під час проведення дослідження [$t_{st}(\text{1доба-7доба}) = 5,49$, при $p = 2,911\text{e-}05$; $t_{st}(\text{1доба-10доба}) = 7,12$, при $p = 1,72\text{e-}06$; $t_{st}(\text{7доба-10доба}) = 2,165$, при $p = 0,04085$ у порівнянні з $t_{tab} = 2,17$ при $p = 0,05$]

Fig. 2. Metal-accumulating activity of sulfur-oxidizing bacteria of the Black Sea according to the degree of purification of aqueous solution from $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ during the study [$t_{st}(\text{1day-7day}) = 5.49$, at $p = 2.911\text{e-}05$; $t_{st}(\text{1day-10day}) = 7.12$ at $p = 1.72\text{e-}06$; $t_{st}(\text{7day-10day}) = 2.165$, at $p = 0.04085$ in comparison with $t_{tab} = 2.17$ at $p = 0.05$]

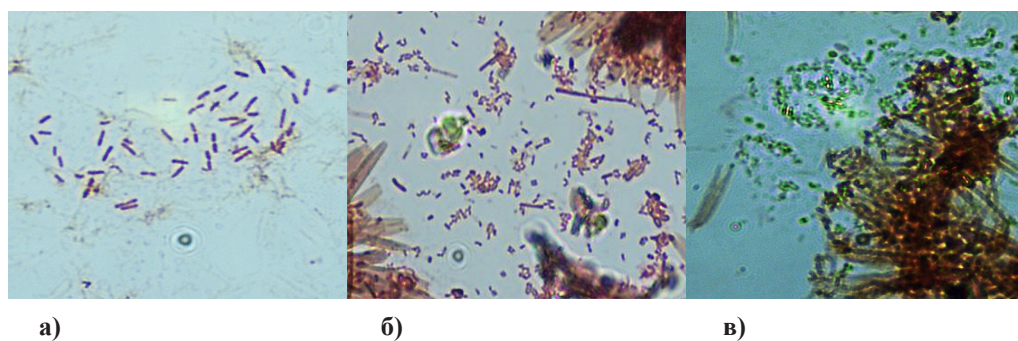


Рис. 3. Мікроскопічні препарати досліджених штамів (на прикладі штаму *Thiobacillus sp. DKZ_4*) протягом першої доби культивування (а), п'ятої доби (б) і десятої доби (в) ($\times 1500$)

Fig. 3. Microscopic preparations of the studied strains (using the example of a strain of *Thiobacillus sp. DKZ_4*) during the first day of cultivation (a), the fifth day (б) and the tenth day (в) ($\times 1500$)

Також відомо, що мікроорганізми здатні утримувати йони міді у периплазмі при активації систем гомеостазу, подібних до системи CopABCD. Взагалі подібна система резистентності та транспорту міді забезпечується чотирма структурними білками, а саме білком внутрішньої мембрани CopD, білком зовнішньої мембрани CopV і двома переплазматичними білками CopA і CopC. Білки CopV, CopA, CopC зв'язують йони Cu^{2+} на зовнішній мембрані або в периплазматичному просторі, надаючи тим самим колоніям блакитного забарвлення. Таким чином, така система резистентності створює в периплазматичному просторі сховище знешкодженної міді [4, 6, 8, 13, 14, 16, 18].

Орієнтуючись на дані літератури можна припустити, що резистентні до міді тіонові бактерії, ізольовані з поверхневих вод Чорного моря, мають саме систему гомеостазу CopABCD і, відповідно здатні до акумуляції міді у периплазматичному просторі, що і пояснює забарвлення клітин на мікроскопічних препаратах.

Таким чином, після проведення експерименту тривалістю в 10 діб можна констатувати, що тіонові бактерії, ізольовані з води Чорного моря, здатні до акумуляції йонів металів з водних розчинів, а Cu-аккумуляційна активність залежить від тривалості взаємодії між мікроорганізмами і розчином. Якщо на першу добу акумуляція майже не спостерігається, то на десяту добу вилучення міді з розчину досягало майже дев'яноста відсотків.

Показано, що рівень резистентності до йонів міді, який був визначений раніше, не корелює зі здатністю бактерій акумулювати мідь.

Штам *Thiobacillus sp.* DKZ_4 та штам *Thiobacillus sp.* DKZ_2 демонстрували максимальну здатність (89,24% 85,25%, відповідно) до вилучення йонів міді з водного розчину.

Отримані результати можуть бути використані для розробки нової біосорбційної біотехнології спрямованої на вилучення металів з водних розчинів.

Н. Ю. Васильєва, Л. І. Слюсаренко, Т. В. Васильєва

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

АККУМУЛЯЦИЯ Cu(II) МОРСКИМИ НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ТИОНОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Реферат

Цель: определить способность нейтрофильных тионовых бактерий извлекать ионы Cu(II) из водных растворов. **Методы.** Объектом исследования была способность морских тионовых бактерий, изолированных из воды Черного моря в районе Одесской бухты к извлечению меди из водного раствора. Для исследования металл-аккумулирующей активности тионовых бактерий, отбирали штаммы, которые были резистентными к меди на уровне 0,01–0,02 моль/л. Начальная концентрация Cu(II) в водном растворе составляла 1 мМ. Срок культивирования микроорганизмов в водном растворе, содержащем медь составлял 10 суток. Остаточное содержание Cu(II) в водном растворе определяли атомно-абсорбционным методом на приборах



AAS-1 (Германия) и C-115ПК Selmi (Украина) при длине волны 324,7 нм для Cu. Достоверность полученных результатов оценивали по критерию Стьюдента с вероятностью $p < 0,05$. **Результаты.** Установлено, что тионовые бактерии, изолированные из воды Черного моря, способные к аккумуляции тяжелых металлов из водных растворов, а Cu-аккумулирующая активность зависит от продолжительности взаимодействия между микроорганизмами и раствором. Максимальный уровень изъятия Cu(II) – 89,24% из водного раствора регистрировали на 10 сутки культивирования при использовании штамма *Thiobacillus* sp. DKZ_4. На седьмые сутки культивирования извлечение Cu (II) из водного раствора при использовании штамма *Thiobacillus* sp. DKZ_2 достигало 85,25%. Было показано, что уровень резистентности к меди, который был определен ранее, не влиял на способность бактерий аккумулировать медь. **Выводы.** Нейтрофильные тионовые бактерии, изолированные из воды Черного моря способны к извлекать из водного раствора от 22,83% до 89,24% Cu(II) и поэтому их можно использовать для разработки биосорбционной биотехнологии особенно в области очистки вод от тяжелых металлов. Способность к аккумуляции Cu зависит от штамма, но не зависит от МИК.

Ключевые слова: нейтрофильные тионовые бактерии, очистка воды, Cu(II).

N. Yu. Vasylieva, L. I. Sliusarenko, T. V. Vasylieva

Odesa National I. I. Mechnykov University,
2, Dvoryanska St., Odesa, 65082, Ukraine,
tel : +38 (0482) 63 51 63, e-mail:tatkamic@onu.edu.ua

CU (II) ACCUMULATION BY MARINE NEUTROPHIL SULFUR-OXIDIZING BACTERIA

Summary

Aim: to determine the ability of neutrophilic sulfur-oxidizing bacteria to extract Cu (II) ions from aqueous solutions. **Methods.** The object of the study was the ability of marine sulfur-oxidizing bacteria isolated from the water of the Black Sea near the Odessa Bay to extract copper from aqueous solution. To study the metal-accumulating activity of sulfur-oxidizing bacteria, we have selected strains that were resistant to copper at the level of 0.01–0.02 mol/l. The initial concentration of Cu (II) in aqueous solution was 1 mM. The period of cultivation of microorganisms in aqueous solution containing copper was 10 days. The residual content of Cu (II) in aqueous solution was determined by the atomic absorption method on AAS-1 devices (Germany) and C-115PC Selmi (Ukraine) at the wavelength of 324.7 nm for Cu. The reliability of the results obtained was assessed on the Student's criterion with probability of $p < 0.05$. **Results.** It was established that sulfur-oxidizing bacteria isolated from the water of the Black Sea capable of accumulating heavy metals from aqueous solutions, and Cu-accumulating activity depends on the duration of the interaction between microorganisms and solution. The maximum level of extraction of Cu (II) from aqueous solution was equal 89.24% was recorded on the 10th day of cultivation using a strain of *Thiobacillus* sp. DKZ 4. On the seventh day of cultivation, the extraction of Cu (II) from aqueous solution with using a strain of *Thiobacillus* sp. DKZ_2 reached 85.25%.



*It was shown that the level of resistance to copper, which had been previously defined, did not affect the ability of bacteria to accumulate copper. **Conclusions.** Neutral sulfur-oxidizing bacteria isolated from the water of the Black Sea are capable of extracting from aqueous solution from 22.83% to 89.24% of Cu (II) and therefore they can be used to develop biosorption biotechnology especially in the field of water purification from heavy metals. The ability to accumulate Cu depends on the strain, but does not depend on MIC.*

Key words: neutrophilic sulfur-oxidizing bacteria, water purification, Cu (II).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Горшкова О. Г., Гудзенко Т. В., Волювач О. В., Беляева Т. О., Коноп І. П. Вилучення Cu(II) з водних розчинів іммобілізованими клітинами бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – № 3. – С. 66–74.
2. Іваниця В. А., Бухтияров А. Е., Лисютин Г. В, Захарія А. Н., Гудзенко Т. В. Аккумуляція важких металів бактеріями роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4. – С. 76–83.
3. Каравайко Г. И., Дубинина Г. А., Кондратьева Т. Ф. Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 5. – С. 593–629
4. Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С. Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів // Вісн. Львів. ун-ту. ім. І. Франка. Сер. біол. – 2007. – Вип. 45. – С. 3–28
5. Помогайло А. Д. Макромолекулярные металлохелаты / А. Д. Помогайло, И. Е. Уфлянд. – М.: Химия, 1991. – 304 с.
6. Таширеву А. Б. Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами. Микробная аккумуляция металлов, обусловленная их стереохимической аналогией с макроэлементами // Мікробіологічний журнал. – 1994. – № 6. – С. 89–97.
7. Таширеву А. Б., Романовская В. А., Сиома И. А. и др. Антарктические микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям Hg²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ и CrO₄²⁻ // Доповіді Національної Академії наук України. – 2008. – № 1. – С. 169–176.
8. Янева О. Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов // Мікробіологічний журнал. – 2009. – Т. 71, № 5. – С. 54–65.
9. González A. G., Shirokova L. S., Pokrovsky O. S et al. Adsorption of copper on *Pseudomonas aureofaciens*: protective role of surface exopolysaccharides. // J Colloid Interf Sci. – 2010. – Vol. 350. – P. 305–314.
10. González-Guerrero M., Raimunda D., Cheng X., Argüello J. M. Distinct functional roles of homologous Cu⁺ efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. // Mol Microbiol. – 2010. – Vol. 78. – P. 1246–1258.
11. Bondarczuk K., Piotrowska-Seget Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria // Cell Biol Toxicol. – 2013. – Vol. 2. – P. 397–405
12. Martínez-Bussenius C., Navarro C. A., Orellana L., Paradela A., Jerez C. A. Global response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 to



high concentrations of copper: A quantitative proteomics approach // Journal of Proteomics. – 2016. – Vol. 145. – P. 37–45.

13. Nies D. H. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. – 1995. – Vol. 177. – P. 2707–2712.

14. Nies H. D. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes // FEMS Microbiol. Rev. – 2003. – Vol. 27, No 2–3. – P. 313–339.

15. Outten F. W., Huffman D. L., Hale J. A., O'Halloran T. V. The independent Cue and Cus system confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. – 276. – P. 30670–30677.

16. Puig S., Rees E. M., Thiele D. J. The ABCDs of periplasmic copper trafficking // Structure. – 2002. – Vol. 10. – P. 1292–1295.

17. Rensing C., Grass G. *Escherichia coli* mechanism of copper homeostasis in a changing environment // FEMS Microbiol. Rev. – 2003. – Vol. – 27. – P. 197–213

18. Rensing C., Fan B., Sharma R., Mitra B., Rosen B. P. CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 652–656

References

1. Gorshkova OG, Gudzenko TV, Voliuvach OV, Beliaeva TO, Konup IP. Isolation of Cu(II) from aqueous solutions by immobilized bacterial cells of the genus *Pseudomonas*. Microbiology and Biotechnology. 2017.3: 66–74. (in Ukrainian)

2. Ivanytsia VO, Bukhtiyarov AE, Lisyutin GV, Zacharya OM, Gudzenko TV. Accumulation of heavy metals by bacteria of genus *Pseudomonas*. Microbiology and Biotechnology. 2012.3: 76–83. (in Russian)

3. Karavaiko HY, Dubynyna HA, Kondrateva TF. Lithotrophic microorganisms of oxidative cycles of sulfur and iron. Microbiology. 2006. 75(5):593–629. (in Russian)

4. Kushkevych IV, Hnatysh SO, Gudz SP Influence of heavy metals on microbial cells. Visnyk of L'viv University. Biological Series. 2007.45:3–28 (in Ukrainian)

5. Pomogailo AD, Ufliand IE. Macromolecular metal chelates. M.: Chemistry, 1991. 304 p. (in Russian)

6. Tashyrev AB. Theoretical aspects of microbial interactions with metals. Reduction transformation of metals. Mikrobiol. zhurn. 1994.56(6):76–88. (in Russian)

7. Tashyrev AB, Romanovskaia VA, Sioma IB, Usenko VP. Antarctic microorganisms resistant to high concentrations of Hg²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ и CrO₄²⁻. Doklady Natsionalnoi Akademii nauk Ukrainy. 2008.1:169–176. (in Russian)

8. Ianieva OD. Mechanisms of bacteria resistance to heavy metals. Mikrobiol. zhurn. 2009.71(6):54–65. (in Russian)

9. González AG., Shirokova LS., Pokrovsky OS et al. Adsorption of copper on *Pseudomonas aureofaciens*: protective role of surface exopolysaccharides. J Colloid Interf Sci. 2010. 350:305–314.

10. González-Guerrero M, Raimunda D, Cheng X, Argüello JM. Distinct



functional roles of homologous Cu⁺ efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol. 2010. 78:1246–1258.

11. Bondarczuk K, Piotrowska-Seget Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. Cell Biol Toxicol. 2013.2:397–405

12. Martínez-Bussenius C., Navarro C. A., Orellana L., Paradelo A., Jerez C. A. Global response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 to high concentrations of copper: A quantitative proteomics approach. Journal of Proteomics. 2016.145: 37-45.

13. Nies DH. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 1995.177: 2707–2712.

14. Nies HD. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev. 2003.27(2–3):313–339.

15. Outten FW, Huffman DL, Hale JA, Ohalloran TV. The independent Cue and Cus system confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 2001.276:30670–30677.

16. Puig S, Rees EM, Thiele DJ. The ABCDs of periplasmic copper trafficking. Structure. 2002.10:1292–1295.

17. Rensing C, Grass G. *Escherichia coli* mechanism of copper homeostasis in a changing environment. FEMS Microbiol. Rev. 2003. 27: 197–213

18. Rensing C, Fan B, Sharma., Mitra B, Rosen BP. CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. 97: 652–656.

Стаття надійшла до редакції 08.04.2019 р.



**АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ,
ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ
«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛГІЯ»
У 2017 РОЦІ**

Автори	№ вип.	№ стор.
1	2	3
<i>Адарма Н. Ю.</i> див. <i>Ліманська Н. В.</i>	1	47
<i>Артюх М. М.</i> див. <i>Лопухова М. А.</i>	4	42
<i>Бакурадзе Ната</i> див. <i>Какабадзе Елена</i>	3	65
<i>Беляєва Т. О.</i> див. <i>Горщикова О. Г.</i>	2	70
<i>Блайда І. А.</i> див. <i>Васильєва Н. Ю.</i>	1	28
<i>Блайда І. А., Васильєва Т. В.</i> Біотехнологічні методи переробки некондиційних руд і промислових відходів	2	6
<i>Буценко Л. М.</i> див. <i>Пастоцук А. Ю.</i>	2	39
<i>Василів О.</i> див. <i>Сегін Т.</i>	1	39
<i>Васильєва Н. Ю., Крилова К. Д., Кристофферсен Й. Б., Дубровіна О. А., Іваниця В. О.</i> Мікробна різноманітність прибережних вод Одеської затоки Чорного моря	4	63
<i>Васильєва Н. Ю., Слюсаренко Л. І., Неццет Л. С., Семенов К. І., Васильєва Т. В., Блайда І. А.</i> Бактеріальне вилуговування металів з відпрацьованої маси паливних елементів	1	28
<i>Васильєва Т. В.</i> див. <i>Блайда І. А.</i>	2	6
<i>Васильєва Т. В.</i> див. <i>Васильєва Н. Ю.</i>	1	28
<i>Верхоляк Н. С., Перетятко Т. Б.</i> Морфофізіологічні властивості сульфатвідновлювальних бактерій, виділених із системи очищення стічних вод м. Львова	4	19
<i>Водзінський С. В.</i> див. <i>Галкін М. Б.</i>	2	26
<i>Волювач О. В.</i> див. <i>Горщикова О. Г.</i>	2	70
<i>Воробець З. Д.</i> див. <i>Лаврик Г. С.</i>		51
<i>Воробйова Н. Г.</i> див. <i>Грицев О. А.</i>	2	81
<i>Галкін Б. М.</i> див. <i>Галкін М. Б.</i>	2	26
<i>Галкін М. Б.</i> див. <i>Ліманська Н. В.</i>	3	36
<i>Галкін М. Б.</i> див. <i>Філіпова Т. О.</i>	1	6
<i>Галкін М. Б., Водзінський С. В., Стрезєва Л. М., Джура М. А., Галкін Б. М., Філіпова Т. О.</i> Формування біоплівки штамми <i>Pseudomonas aeruginosa</i> з різним рівнем внутрішньоклітинного цикло-ди-ГМФ за присутності синтетичних аналогів сигнального хінолону	2	26



1	2	3
Галушка А. А. див. Тарабас О. В.	1	57
Гнатуш С. див. Сегін Т.	1	39
Гнатуш С. О. див. Тарабас О. В.	1	57
Голембівська С. Л., Дворник Т. В., Поліщук Л. В., Мацелюх Б. П. Мінливість каротинсинтезувальних штамів <i>Streptomyces globisporus</i> 1912 після глибинного вирощування та зберігання	3	26
Головенко М. Я. див. Філіпова Т. О.	1	6
Горшкова О. Г., Гудзенко Т. В., Волювач О. В., Конуп І. П., Беляєва Т. О. Очищення води від фенолу та йонів важких металів асоціацією бактерій роду <i>Pseudomonas</i>	2	70
Грдзелишвілі Ніно див. Какабадзе Елена	3	65
Грицев О. А., Зозуля О. Л., Воробйова Н. Г., Сківка Л. М. Моніторинг видового складу грибів роду <i>Fusarium</i> у насінневому матеріалі озимої пшениці на території України	2	81
Гудзенко Т. В. див. Горшкова О. Г.	2	70
Дворник Т. В. див. Голембівська С. Л.	3	26
Джура М. А. див. Галкін М. Б.	2	26
Дубровіна О. А. див. Васильєва Н. Ю.	4	63
Зінченко О. Ю., Міресь С. Л. Антимікробні властивості міцелію та екстрактів плодівих тіл <i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	2	49
Зозуля О.Л. див. Грицев О. А.	2	81
Іваниця В. О. див. Васильєва Н. Ю.	4	63
Іваниця В. О. див. Твердохліб В. С.	4	6
Іваниця В. О. див. Ліманська Н. В.	3	36
Іваниця В. О. див. Штеніков М. Д.	3	82
Іваниця Т. В., Страшнова І. В. Чисельність і біологічні властивості бактерій <i>Pantoea agglomerans</i> , виділених з різних сортів винограду Одеської області	3	50
Іваниця Т. В., Страшнова І. В., Смальчук Д. С. Загальна характеристика бактерій роду <i>Pantoea</i>	3	6
Какабадзе Елена, Бакурадзе Ната, Грдзелишвілі Ніно, Макалатія Хатуна, Натрошвілі Гульнара, Чанішвілі Ніна Мікробіологічне дослідження кавказького продукту мацоні	3	65



1	2	3
Конуп І. П. див. Горшкова О. Г.	2	70
Корнійчук О. П. див. Лаврик Г. С.	4	51
Коротаєва Н. В. див. Мерліч А. Г.	3	75
Короткий Ю. В. див. Настенко В. Б.	1	18
Крилова К. Д. див. Васильєва Н. Ю.	4	63
Крилова К.Д. див. Твердохліб В. С.	4	6
Кристофферсен Й. Б. див. Васильєва Н. Ю.	4	63
Крисько А. А. див. Романовська І. І.	2	60
Лаврик Г. С., Корнійчук О. П., Федорович З. Я., Воробець З.Д. НО-синтазна активність лейкоцитів периферичної крові у хворих на <i>асне vulgaris</i>	4	51
Ліманська Н. В. див. Твердохліб В. С.	4	6
Ліманська Н. В., Адарма Н. Ю. Вплив <i>Lactobacillus plantarum</i> на <i>Fusarium sp.</i> збудника фузаріозу сіянцив сосни	1	47
Ліманська Н. В., Соколова Н. В., Судак А. А., Галкін М. Б., Іваниця В. О. Вплив <i>Lactobacillus plantarum</i> на ріст пшениці на гідропонії та у ґрунті	3	36
Лопухова М. А., Паузер О. Б., Якуба І. П., Артюх М. М. Якість соку та вина з винограду Ароматний та Каберне Совіньйон за обробки лози біопрепаратом АгроМар	4	42
Макалатія Хатуна див. Какабадзе Елена	3	65
Масловська О. див. Сегін Т.	1	39
Мацелюх Б. П. див. Голембіовська С. Л.	3	26
Мерліч А. Г., Коротаєва Н. В. Склад жирних кислот бактерій штаму <i>Enterococcus</i> <i>italicus</i> ОНУ547	3	75
Мірось С. Л. див. Зінченко О. Ю.	2	49
Мороз О. М. див. Тарабас О. В.	1	57
Настенко В. Б., Короткий Ю. В., Смертенко О. А., Осипчук Н. О., Ширококов В. П., Чоботар А. П. Вивчення протимікробної активності солей алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію щодо референтних штамів мікроорганізмів	1	18
Натрошвілі Гульнара див. Какабадзе Елена	3	65
Нещерет Л. С. див. Васильєва Н. Ю.	1	28
Осипчук Н. О. див. Настенко В. Б.	1	18

1	2	3
<i>Останчук А. М. див. Штеніков М. Д.</i>	3	82
<i>Пастоцьук А. Ю., Сківка Л. М., Буценко Л. М., Патица В. П.</i> Вплив збудника базального бактеріозу на проростання зерен та ріст паростків пшениці різних сортів	2	39
<i>Патица В. П. див. Пастоцьук А. Ю.</i>	2	39
<i>Паузер О. Б. див. Лопухова М. А.</i>	4	42
<i>Перетятко Т. Б. див. Верхоляк Н. С.</i>	4	19
<i>Поліщук Л. В. див. Голембіовська С. Л.</i>	3	26
<i>Романовська І. І., Севастьянов О. В., Шестеренко Є. А., Крисько А. А., Шестеренко Ю. А., Топтіков В. А.</i> Карбоксилестерази гомогенатів травних залоз <i>Rapana venosa</i>	2	60
<i>Севастьянов О. В. див. Романовська І. І.</i>	2	60
<i>Сегін Т., Гнатуш С., Масловська О., Василів О.</i> Активність ензимів глутатіонової антиоксидантної системи бактерій <i>Chlorobium limicola</i> ІМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату	1	39
<i>Семенов К. І. див. Васильєва Н. Ю.</i>	1	28
<i>Сергієнко В. Г. див. Титова Л. В.</i>	4	30
<i>Сківка Л. М. див. Грицев О. А.</i>	2	81
<i>Сківка Л. М. див. Пастоцьук А. Ю.</i>	2	39
<i>Слюсаренко Л. І. див. Васильєва Н. Ю.</i>	1	28
<i>Смальчук Д. С. див. Іваниця Т. В.</i>	3	6
<i>Смертенко О. А. див. Настенко В. Б.</i>	1	18
<i>Соколова Н. В. див. Ліманська Н. В.</i>	3	36
<i>Страшнова І. В. див. Іваниця Т. В.</i>	3	6
<i>Страшнова І. В. див. Іваниця Т. В.</i>	3	50
<i>Стрезєва Л.М. див. Галкін М. Б.</i>	2	26
<i>Судак А. А. див. Ліманська Н. В.</i>	3	36
<i>Тарабас О. В., Гнатуш С. О., Галушка А. А., Мороз О. М.</i> Пігменти <i>Rhodopseudomonas yavorovii</i> ІМВ В-7620	1	57
<i>Твердохліб В. С., Ліманська Н. В., Крилова К. Д., Іваниця В. О.</i> Вплив бактерій <i>Lactobacillus plantarum</i> ОНУ 12 і <i>Vacillus megaterium</i> ОНУ 484 на проростання та ріст сіяньців пшениці	4	6
<i>Теслюк Н. І.</i> Утворення множинних пагонів винограду в культурі <i>in vitro</i> на різних живильних середовищах	1	66



1	2	3
<i>Титова Л. В., Сергієнко В. Г.</i> Ефективність комплексного застосування мікробних препаратів з фунгіцидами для контролю захворювань та підвищення продуктивності овочевих культур	4	30
<i>Топтіков В. А. див. Романовська І. І.</i>	2	60
<i>Федорович З. Я. див. Лаврик Г. С.</i>	4	51
<i>Філіпова Т. О. див. Галкін М. Б.</i>	2	26
<i>Філіпова Т. О., Галкін М. Б., Головенко М. Я.</i> Визначення мутагенних властивостей тилорону – активного фармацевтичного інгредієнту аміксіну, в мікропланшетному варіанті тесту Еймса	1	6
<i>Чанішвілі Ніна див. Какабадзе Елена</i>	3	65
<i>Чоботар А. П. див. Настенко В. Б.</i>	1	18
<i>Шестеренко Є. А. див. Романовська І. І.</i>	2	60
<i>Шестеренко Ю. А. див. Романовська І. І.</i>	2	60
<i>Широбоков В. П. див. Настенко В. Б.</i>	1	18
<i>Штеніков М. Д., Остапчук А. М., Іваниця В. О.</i> Антимікробна активність спороутворювальних бактерій глибоководних відкладень Чорного моря	3	82
<i>Якуба І. П. див. Лопухова М. А.</i>	4	42

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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

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

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

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;
- Реферат мовою оригіналу статті:
 - назва статті великими літерами;
 - прізвища та ініціали автора (авторів);



- місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail);
- Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти).

- Реферат англійською мовою:

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

- Повний текст статті мовою оригіналу.

Текст статті має включати такі складові:

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

До кожного примірника статті додається реферат мовою оригіналу статті (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. – 9th ed. – Baltimore; London, 1986. – Vol. 2. – 1599 p.

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

На журнальні статті

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

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



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

Eaton R. W., Ribbons D. V. Utilization of 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 GdYVO₄:Eu³⁺ with cell nuclei. Dop Nats Akad Nauk Ukr. 2010;(10):81–86.

Книги:

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

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

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

Матеріали з'їздів, конференцій:

Dikova B, 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/

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 23.04.2019 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 6,42. Тираж 100 пр.
Зам. № 1914.

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