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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал

Виходить 4 рази на рік

Засновано у липні 2006 року

№ 2(34)
2016

Одеса
ОНУ
2016

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

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються
Затверджено до друку Вченою радою
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.
Протокол № 3 від 24.03.2015 р.
Постановою Президії ВАК від 27.05.2009 № 1-05/2 журнал внесено до переліку наукових фахових видань України

Реферативна база даних «Україніка наукова», Index Copernicus Journals Master List, Наукова періодика України (Національна бібліотека України імені В.І. Вернадського), Ulrich's periodicals, Електронний архів-репозитарій Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, Наукова періодика України (journal.uran.ua), Українські наукові журнали (usj.org.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Reseach Bib

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

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

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University.
Minutes No 3, 24.03.2015

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).

Bibliographic Database "Ukrainika scientific", Index Copernicus Journals Master List, Scientific Periodicals in National Library of Ukraine Vernadsky, Ulrich's periodicals, Scientific Periodicals of Ukrain (journal.uran.ua), Ukrainian Scientific journals (usj.org.ua), Institutional Repository at Odesa I.I. Mechnykov National University, Google Scholar, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Scientific Periodicals of Ukrain (journal.uran.ua), Reseach Bib

Publishibing editor N.G. Yurgelaitis
Editors: L.B. Kotlyarova, I.V. Raiko

Address:
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

З М І С Т

Е К С П Е Р И М Е Н Т А Л Ь Н І П Р А Ц І

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.2(34).70746

УДК 582.263:58.04:581.132

Н.Ф. Михайленко

Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України,
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01004, Україна,
тел.: +38 (044) 272 32 31, e-mail: membrana@ukr.net

РІСТ ТА ФОТОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЗЕЛЕНИХ ВОДОРОСТЕЙ *CHLORELLA VULGARIS* BEIJER. В ПРИСУТНОСТІ НАНОАКВАХЕЛАТІВ СЕЛЕНУ

Мета. *Дослідження впливу нової форми селеновмісних препаратів – наноаквахелатів селену, карбоксильованих лимонною кислотою, – на нагромадження біомаси та ефективність протікання реакцій світлової стадії фотосинтезу у одноклітинної зеленої водорості Chlorella vulgaris.* ***Матеріали і методи***. *Водорості вирощували в стерильних умовах у колбах місткістю 1 л на рідкому мінеральному середовищі при температурі 25–26 °С і цілодобовому освітленні зі щільністю потоку фотонів 40–42 мкмоль* $м^{-2}\cdot с^{-1}$. *Безпосередньо після посіву до культур водоростей додавали розчин карбоксильованих лимонною кислотою наноаквахелатів селену. Масу сухої речовини водоростей визначали гравіметричним методом. Модульовану флуоресценцію хлорофілу а вимірювали при кімнатній температурі і обчислювали основні параметри флуоресценції.* ***Результати***. *Наноаквахелати селену в концентраціях 0,4–4 мг/л стимулювали ріст C. vulgaris, причому збільшення біомаси досягало 40–45%. Додавання наночастинок селену в менших концентраціях (0,07 або 0,2 мг/л) спочатку приводило до уповільнення росту культури, проте цей ефект зникав після 18–24 діб культивування. Наноаквахелати селену при додаванні до культур C. vulgaris в концентраціях від 0,4 до 4 мг/л викликали початкове підвищення максимальної ефективності фотохімічних реакцій у фотосистемі II (ФСII) та ефективності фотохімічних реакцій у відкритих реакційних центрах ФСII. Через 6 діб після додавання 2 чи 4 мг/л наночастинок селену зростав також коефіцієнт фотохімічного гасіння флуоресценції. Як наслідок, підвищувався квантовий вихід електронного транспорту у ФСII.* ***Висновок.*** *Наноаквахелати селену, карбоксильовані лимонною кислотою, в концентраціях від 0,4 до 4 мг/л позитивно впливають на нагромадження біомаси C. vulgaris, а також тимчасово підвищують ефективність протікання фотохімічних реакцій у фотосистемі II.*

Ключові слова: зелені водорості, селен, наночастинки, продуктивність, флуоресценція хлорофілу.

Селен (Se) – мікроелемент, необхідний не лише для гетеротрофних організмів, включаючи ссавців, риб та багато бактерій, але також для деяких зелених водоростей. Разом з тим, фізіологічне значення селену для інших фотосинтезуючих організмів, включаючи вищі рослини, остаточно не визначено [6]. У живих організмах селен міститься переважно у формі селеновмісних білків, заміщуючи атоми сульфуру в деяких залишках цистеїну і метіоніну. Селен відіграє важливу роль у метаболізмі, насамперед за рахунок залучення в процеси захисту від оксидативного стресу. Зокрема, селен входить до складу активних центрів таких ферментів антиоксидантного захисту, як глутатіонпероксидази і тіоредоксинредуктази [12]. Водночас, високі концентрації селену (для багатьох рослин – 1–10 мг/кг і вище) є токсичними [6, 7]. Передусім це зумовлено його надмірним включенням в амінокислоти, що призводить до змін структури білків та порушень їхніх ферментативних функцій. Діапазон концентрацій, що існує між необхідною для організму кількістю селену та його токсичною дією, дуже вузький і залежить від ступеня окиснення селену, типу селеновмісної сполуки, виду організму та інших чинників [4, 7, 13].

Традиційно для забезпечення організмів селеном використовують неорганічні солі – селеніт (SeO_3^{2-}) і селенат (SeO_4^{2-}). Однак перспективним джерелом селену, як і інших мікроелементів, необхідних для метаболізму рослин, є наноматеріали, причому не лише колоїдні розчини наночастинок, але й так звані наноаквахелати – наночастинки, які утримують навколо себе молекули води і/або карбонових кислот як лігандів. Структуру наноаквахелатів описує загальна формула $[\eta M^{2n-}(H_2O)_m(HOOCR)_p]^{2n-}$, де ηM^{2n-} – наночастинка-ядро з електричним зарядом 2n– на поверхні, m – кількість лігандів H_2O, p – кількість лігандів RCOOH [14]. Величина негативного електричного заряду на поверхні наночастинки 2n пов'язана з кількістю лігандів m і p співвідношенням: $2n = 2m + p$. Здатність гідратованих або карбоксильованих наночастинок легко проникати крізь клітинні мембрани та потім звільнятися від лігандів зумовлює їхню високу біологічну активність укупі з біосумісністю. До того ж, технологія одержання наноаквахелатів забезпечує надзвичайно низьку кількість домішок у кінцевому продукті [1]. Токсичність наноаквахелатів є набагато нижчою, ніж відповідних неорганічних солей [1, 14]. Зараз широко використовуються надчисті наноаквахелати основних біогенних і біоцидних елементів [1]. Перспективним є карбоксилювання наноаквахелатів нетоксичною лимонною кислотою.

Метою даної роботи було дослідження впливу наноаквахелатів селену, карбоксильованих лимонною кислотою, на нагромадження біомаси та ефективність протікання реакцій світлової стадії фотосинтезу у *Chlorella vulgaris* – одноклітинної зеленої водорості, широко застосовуваної в багатьох галузях біотехнології. Впровадження нових підходів до оптимізації культивування водоростей у перспективі розширює можливості їх використання як сировини для виробництва цінних хімічних сполук і нових видів біопалива, що відповідають основним викликам сучасності [2, 3].

Матеріали і методи

Chlorella vulgaris Beijer. вирощували в стерильних умовах у колбах Ерленмейєра місткістю 1 л на 0,4 л рідкого мінерального модифікованого середовища Тамія [3] при температурі 25–26 °С і цілодобовому освітленні люмінесцентними лампами ЛБ 40 зі щільністю потоку квантів фотосинтетично активної радіації (ФАР) 40–42 мкмоль $м^{-2}·с^{-1}$, перемішували шляхом струшування двічі на добу. Безпосередньо після посіву до культур водоростей додавали розчин карбоксильованих лимонною кислотою наноаквахелатів селену, люб'язно наданих проф. В.Г. Каплуненко (Український державний НДІ «Ресурс») [14, 15]. Культуру, залишену без додавання наноаквахелатів селену, використовували як контрольний зразок. Масу сухої речовини водоростей визначали гравіметричним методом. Модульовану флуоресценцію хлорофілу *a* вимірювали при кімнатній температурі за допомогою флуориметра XE-PAM (Heinz Walz GmbH, ФРН), джерелом діючого та насичуючого світла була галогенова лампа 8 В / 20 Вт (Bellaphot, Osram). Початку вимірювань передувало витримування зразка протягом 10 хв у темряві в оснащеній мішалкою кюветі флуориметра. Спалахи вимірювального світла ксенонової газорозрядної лампи (2 Гц, 0,15 мкмоль $м^{-2}·с^{-1}$) не викликали фотохімічного розділення зарядів у реакційних центрах фотосистеми II (ФСII) [10]. Щільність потоку квантів ФАР діючого світла була такою ж, як при культивуванні водоростей. Інтенсивність та тривалість спалахів насичуючого світла (5500 мкмоль $м^{-2}·с^{-1}$, 1 с) були підібрані таким чином, щоб забезпечити повне закриття всіх реакційних центрів ФСII. Обчислювали основні параметри флуоресценції – максимальну ефективність фотохімічних реакцій у ФСII (F_v/F_m), ефективність фотохімічних реакцій у відкритих реакційних центрах ФСII (F_v'/F_m'), коефіцієнт фотохімічного гасіння флуоресценції (q_P), нефотохімічне гасіння флуоресценції (NPQ) та квантовий вихід електронного транспорту у ФСII ($Ф_{PSII}$) [8]. Результати наведені у вигляді середніх значень зі стандартними відхиленнями (n = 9).

Результати та їх обговорення

При додаванні 2 чи 4 мг наноаквахелатів селену на 1 л культури водоростей вже за 6 діб нагромадження біомаси *C. vulgaris* зростало приблизно в 1,4 рази (рис. 1). Позитивна дія наночастинок Se на ріст зберігалася впродовж усього експерименту, хоча і дещо послаблювалася з часом. Якщо ж наноаквахелати Se додавали до концентрації 0,4 мг/л, то протягом перших 18 діб ріст прискорювався лише на 7–11%, однак надалі ефект зростав і ставав таким самим, що і у випадку 5- чи 10-разово вищої концентрації наноаквахелатів Se. Зменшення концентрації наночастинок Se до 0,2 і далі до 0,07 мг/л приводило до уповільнення росту культури порівняно з контрольним зразком на 12 добу досліду, однак маса сухої речовини переставала відрізнятися від контрольної культури на 18 добу у випадку додавання 0,2 мг/л наноаквахелатів Se і на 24 добу – після додавання 0,07 мг/л наноаквахелатів Se.

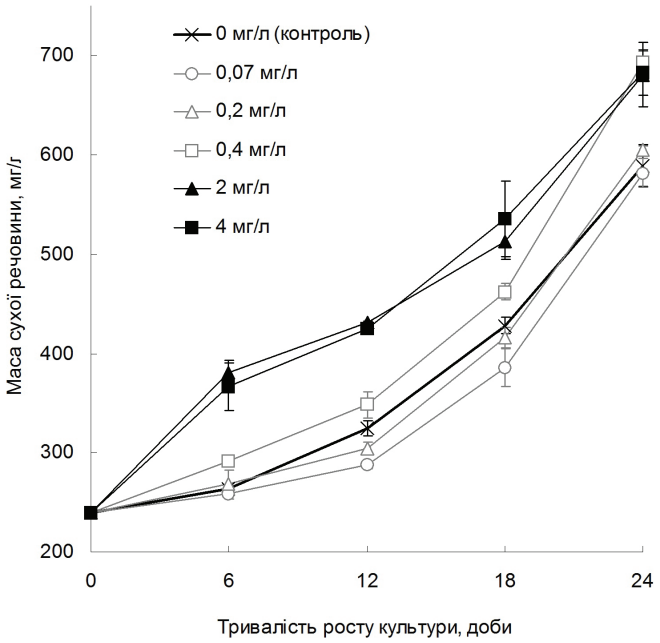


Рис. 1. Нагромадження біомаси *Chlorella vulgaris* при культивуванні в присутності наноаквахелатів селену.

Fig. 1. Accumulation of *Chlorella vulgaris* biomass under cultivation in the presence of selenium nanoaquachelates.

З літературних джерел відомо, що неорганічні солі селену у діапазоні концентрацій, близькому до описаного вище, здатні як стимулювати, так і пригнічувати ріст різних видів водоростей [4, 5, 11, 12, 13]. Наприклад, ріст *C. vulgaris* у колбах Ерленмейєра при температурі та щільності потоку квантів ФАР, аналогічних застосованим у цій роботі, стимулював селеніт натрію в концентраціях від 25 до 75 мг/л [11].

Додавання наноаквахелатів Se (0,4–4 мг/л) до культур *C. vulgaris* спричиняло початкове підвищення максимальної ефективності фотохімічних реакцій у ФСІІ, яку характеризує параметр флуоресценції F_v/F_m (рис. 2*А*), а також ефективності фотохімічних реакцій у відкритих реакційних центрах ФСІІ, оцінюваної за параметром F_v'/F_m' (рис. 2*Б*). Ступінь прояву і тривалість дії наноаквахелатів Se зростали з підвищенням їх концентрації. Під дією 2 і 4 мг/л наночастинок Se на 6 добу зростав також коефіцієнт фотохімічного гасіння флуоресценції (q_P), що оцінює відносну частку відкритих реакційних центрів ФСІІ (рис. 2*В*). У присутності 4 мг/л наночастинок Se протягом всього експерименту вірогідно підвищеним було нефотохімічне гасіння флуоресценції (NPQ) (рис. 2*Г*), яке характеризує витрати енергії у ФСІІ, не пов'язані безпосередньо з фотохімічними реакціями. Зростання F_v'/F_m', в основному, було причиною відповідного підвищення квантового виходу електронного транспорту у ФСІІ (Φ_{PSII}) – узагальнюючого показника, який математично являє собою добуток F_v'/F_m' і q_P

(рис. 2*Д*). Як було показано раніше [10], цитрат у мілімолярних концентраціях, на відміну від цукрів [9], не чинив істотного впливу на фотосинтетичні параметри водоростей. Тому в даній роботі можливий ефект нано- та мікромолярних концентрацій цитрату, наявних у культурах *C. vulgaris*, не вивчався.

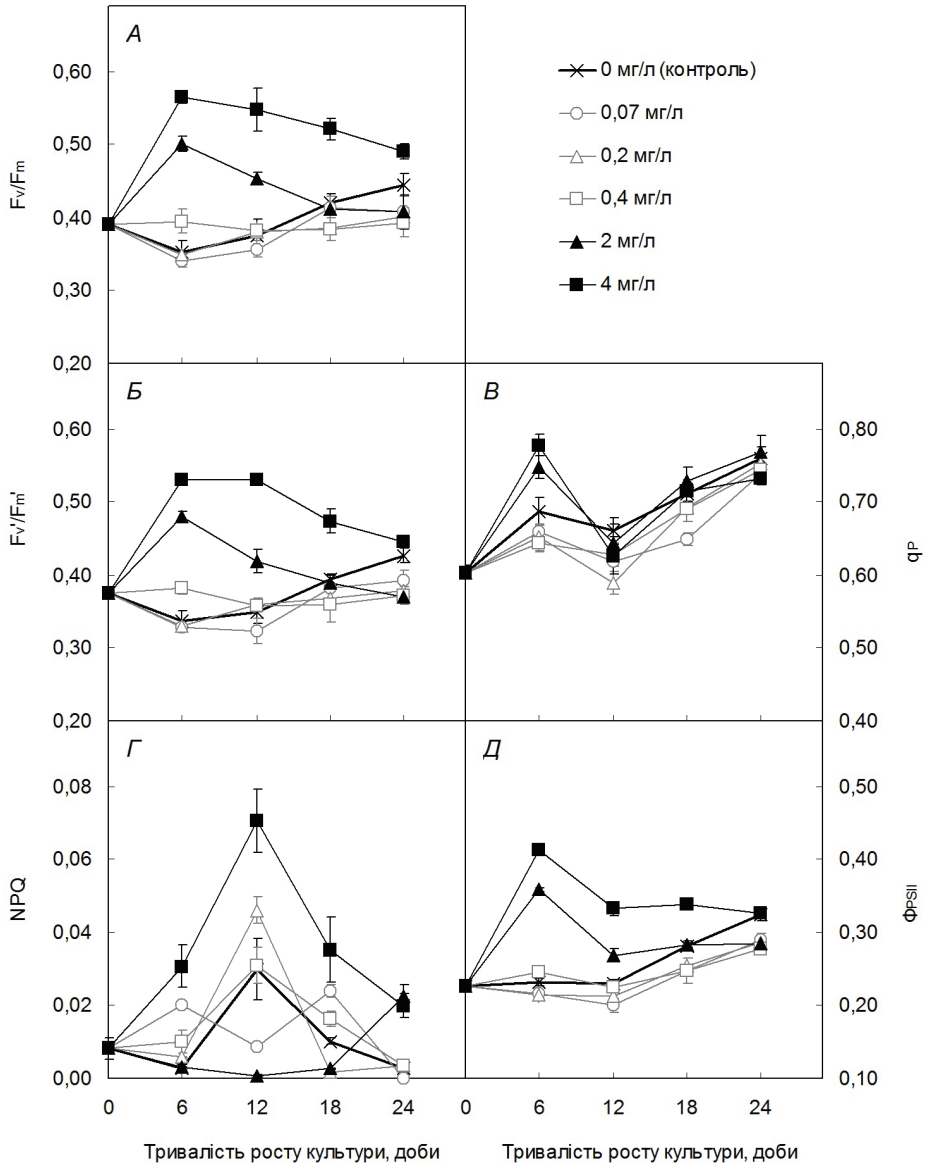


Рис. 2. Параметри флуоресценції хлорофілу *Chlorella vulgaris* у процесі культивування за різного вмісту наноаквахелатів селену в середовищі.

Fig. 2. Chlorophyll fluorescence parameters of *Chlorella vulgaris* during cultivation under various selenium nanoaquachelate content in culture medium.

Про вплив селену в будь-якій формі на процеси фотосинтезу досі було відомо мало. Повідомляли, що селенат (120 мг/л) стимулював нагромадження крохмалю в клітинах зеленої водорості *Scenedesmus quadricauda* [12], а селеніт у концентраціях до 75 мг/л підвищував вміст хлорофілу *a* і каротиноїдів впродовж 6 діб культивування *C. vulgaris* [11]. Раніше повідомлялося, що селен не стимулює фотосинтез в *Euglena gracilis* [5], однак у цьому випадку застосовували селеніт, максимальна концентрація якого була до того ж удесятеро меншою, ніж при нашому дослідженні. Тому отримані дані є одним з перших кроків на шляху розуміння механізмів впливу селену на фотосинтетичну продуктивність водоростей. Подальші дослідження потребують зокрема, детального вивчення ефектів, які здійснюють на фотосинтез наноаквахелати селену, в порівнянні з його неорганічними сполуками.

Таким чином, дослідженнями встановлено, що карбоксильовані лимонною кислотою наноаквахелати селену в концентраціях від 0,4 до 4 мг/л позитивно впливають на нагромадження біомаси *Chlorella vulgaris*, а також тимчасово підвищують ефективність протікання фотохімічних реакцій у фотосистемі II. Подальші дослідження в цьому напрямку сприятимуть удосконаленню технологій фототрофного культивування зелених водоростей.

Н.Ф. Михайленко

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, Киев, 01004, Украина,
тел.: +38 (044) 272 32 31, e-mail: membrana@ukr.net

РОСТ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЗЕЛЕНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ *CHLORELLA VULGARIS* BEIJER. В ПРИСУТСТВИИ НАНОАКВАХЕЛАТОВ СЕЛЕНА

Реферат

Цель. *Исследование влияния новой формы селеносодержащих препаратов – наноаквахелатов селена, карбоксилированных лимонной кислотой, – на накопление биомассы и эффективность протекания реакций световой стадии фотосинтеза у одноклеточной зеленой водоросли Chlorella vulgaris.* ***Материалы и методы***. *Водоросли выращивали в стерильных условиях в колбах емкостью 1 л на жидкой минеральной среде при температуре 25–26 °С и круглосуточном освещении с плотностью потока фотонов 40–42 мкмоль* $м^{-2} \cdot с^{-1}$. *Непосредственно после посева к культурам водорослей добавляли раствор карбоксилированных лимонной кислотой наноаквахелатов селена. Массу сухого вещества водорослей определяли гравиметрическим методом. Модулированную флуоресценцию хлорофилла а измеряли при комнатной температуре и вычисляли основные параметры флуоресценции.* ***Результаты***. *Наноаквахелаты селена в концентрациях 0,4–4 мг/л стимулировали рост C. vulgaris, причем увеличение биомассы достигало 40–45%. Добавление наночастиц селена в меньших концентрациях (0,07 либо 0,2 мг/л) сначала приводило к замедлению роста культуры, однако этот эффект исчезал после 18–24 суток культивирования. Наноаквахелаты селена при добавлении к*

культурам C. vulgaris в концентрациях от 0,4 до 4 мг/л вызывали начальное повышение максимальной эффективности фотохимических реакций в фотосистеме II (ФСII) и эффективности фотохимических реакций в открытых реакционных центрах ФСII. Через 6 суток после добавления 2 или 4 мг/л наночастиц селена возрастал также коэффициент фотохимического тушения флуоресценции. Вследствие этого повышался квантовый выход электронного транспорта в ФСII. ***Вывод.*** *Наноаквахелаты селена, карбоксилированные лимонной кислотой, в концентрациях от 0,4 до 4 мг/л положительно влияют на накопление биомассы C. vulgaris, а также временно повышают эффективность протекания фотохимических реакций в фотосистеме II.*

Ключевые слова: зеленые водоросли, селен, наночастицы, продуктивность, флуоресценция хлорофилла.

N.F. Mykhailenko

M.G. Kholodny Institute of Botany of National Academy of Sciences of Ukraine, 2, Tereshchenkivska str., Kyiv, 01004, Ukraine,
tel.: +38 (044) 272 32 31, e-mail: membrana@ukr.net

GROWTH AND PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY OF GREEN ALGAE *CHLORELLA VULGARIS* BEIJER. IN THE PRESENCE OF SELENIUM NANOAQUACHELATES

Summary

Aim*. Study of the influence of the novel form of selenium-containing additives, selenium nanoaquachelates carboxylated with citric acid, on biomass accumulation and efficiency of the reactions of the light stage of photosynthesis in unicellular green algae Chlorella vulgaris.* ***Materials and methods****. Algae were grown under sterile conditions in 1 L flasks on liquid mineral medium at 25–26 °C. Cultures were provided with continuous irradiation with 40–42 µmol $m^{-2} \cdot s^{-1}$ photon flux density. The solution of selenium nanoaquachelates carboxylated with citric acid was added to algal cultures immediately after inoculation. The dry mass of algae was determined gravimetrically. Modulated chlorophyll a fluorescence was measured at room temperature, and common fluorescence parameters were calculated.* ***Results****. Selenium nanoaquachelates at 0.4–4 mg/L concentrations stimulated the growth of C. vulgaris, and the increase in biomass reached 40–45%. The addition of Se nanoparticles at smaller concentrations (0.07 or 0.2 mg/L) at first caused the retardation of culture growth, but that effect disappeared after 18–24 days of cultivation. When added to C. vulgaris cultures at 0.4–4 mg/L concentrations, selenium nanoaquachelates evoked the initial increase in maximal efficiency of Photosystem II (PSII) photochemical reactions and in the efficiency of photochemical reactions in open PSII reaction centres. After 6 days of the addition of 2 or 4 mg/L selenium nanoparticles, the fluorescence photochemical quenching coefficient also increased. As a result, the quantum yield of PSII electron transport has risen.* ***Conclusion.*** *Selenium nanoaquachelates carboxylated with citric acid, being added to C. vulgaris cultures at 0.4–4 mg/L concentrations, have positive effect on biomass accumulation, and transiently improve the efficiency of Photosystem II photochemical reactions as well.*

Key words: green algae, selenium, nanoparticles, productivity, chlorophyll fluorescence.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Борисевич В.Б., Каплуненко В.Г., Косинов Н.В., Борисевич Б.В., Сухонос В.П., Хомин Н.М., Телятников А.В., Волошина Н.А., Ткаченко С.М., Дорощук В.А., Корж А.В., Литвиненко Д.Ю., Кулида М.А., Кулинич С.Л., Борисевич В.Б. (мл.), Борисевич Ю.Б., Димчев В.А.* Наноматериалы и нанотехнологии в ветеринарной практике. – К.: ВД «Авіцена», 2012. – 512 с.

2. *Золотарьова О., Шнюкова Є.* Куди прямує біопаливна індустрія? // Вісник НАН України. – 2010. – № 4. – С. 10–20.

3. *Перспективи* використання мікроводоростей у біотехнології / О.К. Золотарьова, Є.І. Шнюкова, О.О. Сиваш, Н.Ф. Михайленко. – К.: Альтерпрес, 2008. – 234 с.

4. *Abdel-Hamid M.I., Skulberg O.M.* Effect of selenium on the growth of some selected green and blue-green algae // Lakes & Reservoirs: Research & Management. – 1995. – 1, № 3. – P. 205–211.

5. *Ekelund N.G.A., Danilov R.A.* The influence of selenium on photosynthesis and "light-enhanced dark respiration" (LEDR) in the flagellate *Euglena gracilis* after exposure to ultraviolet radiation // Aquat. Sci. – 2001. – 63, № 4. – P. 457–465.

6. *Germ M., Stibilj V., Kreft I.* Metabolic importance of selenium for plants // Eur. J. Plant Sci. Biotechnol. – 2007. – 1, № 1. – P. 91–97.

7. *Hamilton S.J.* Review of selenium toxicity in the aquatic food chain // Sci. Total Environ. – 2004. – 326, № 1–3. – P. 1–31.

8. *Murchie E.H., Lawson T.* Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications // J. Exp. Bot. – 2013. – 64, № 13. – P. 3983–3998.

9. *Mykhaylenko N.F., Syvash O.O., Tupik N.D., Zolotareva O.K.* Exogenous hexoses cause quantitative changes of pigment and glycerolipid composition in filamentous cyanobacteria // Photosynthetica. – 2004. – 42, № 1. – P. 105–110.

10. *Mykhaylenko N.F.* The modes of glucose action on photosynthesis of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. (*Cyanophyta*) as revealed by chlorophyll fluorescence analysis // International Journal on Algae. – 2005. – 7, № 3. – P. 213–227.

11. *Sun X., Zhong Y., Huang Z., Yang Y.* Selenium accumulation in unicellular green alga *Chlorella vulgaris* and its effects on antioxidant enzymes and content of photosynthetic pigments // PLOS One. – 2014. – 9, № 11. – e112270.

12. *Vítová M., Bišová K., Hlavová M., Zachleder V., Rucki M., Čížková M.* Glutathione peroxidase activity in the selenium-treated alga *Scenedesmus quadricauda* // Aquat. Toxicol. – 2011. – 102, № 1–2. – P. 87–94.

13. *Wheeler A.E., Zingaro R.A., Irgolic K., Bottino N.R.* The effect of selenate, selenite, and sulfate on the growth of six unicellular marine algae // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 1982. – 57, № 2–3. – P. 181–194.

14. *Патент України №* 35582, МПК B01J 13/00, B32B 5/00, A61N 1/40, H01J 19/00. Спосіб отримання гідратованих і карботованих наночастинок "електроімпульсна нанотехнологія отримання гідратованих і карботованих наночастинок" / Косінов М.В., Каплуненко В.Г. (Україна). – № 35582; заявл. 29.04.2008; опубл. 25.09.2008, Бюл. № 18.

15. *Патент України №* 49050, МПК C07C 51/41, C07F 5/00, C07F 15/00, C07C 53/00, B82B 3/00. Спосіб Каплуненка-Косінова отримання карбоксилатів з використанням нанотехнології / Косінов М.В., Каплуненко В.Г. (Україна). – № 49050; заявл. 23.11.2009; опубл. 12.04.2010, Бюл. № 7.

References

1. Borisevich VB, Kaplunenko VG, Kosinov NV, Borisevich BV, Sukhonos VP, Khomin NM, Teliatnikov AV, Voloshina NA, Tkachenko SM, Doroshchuk VA, Korzh AV, Litvinenko DIu, Kulida MA, Kulinich SL, Borisevich VB(Jr), Borisevich IuB, Dimchev VA. Nanomaterials and nanotechnologies in the veterinary practice. Kyiv: VD «Avitsena», 2012. 512 p.

2. Zolotareva O, Shniukova Ie. Where biofuel industry goes to? Visnyk NAN Ukrainy. 2010;(4):10-20.

3. Zolotareva OK, Shniukova IeI, Syvash OO, Mykhailenko NF. Prospects of microalgae utilization in biotechnology. Kyiv: Alterpres, 2008. 234 p.

4. Abdel-Hamid MI, Skulberg OM. Effect of selenium on the growth of some selected green and blue-green algae. Lakes & Reservoirs: Research & Management. 1995;1(3):205-211. doi: 10.1111/j.1440-1770.1995.tb00025.x

5. Ekelund NGA, Danilov RA. The influence of selenium on photosynthesis and "light-enhanced dark respiration" (LEDR) in the flagellate *Euglena gracilis* after exposure to ultraviolet radiation. Aquatic Sciences. 2001;63(4):457-465. doi: 10.1007/s00027-001-8044-7

6. Germ M, Stibilj V, Kreft I. Metabolic importance of selenium for plants. The European Journal of Plant Science and Biotechnology. 2007;1(1):91-97.

7. Hamilton SJ. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. Science of the Total Environment. 2004;326(1-3):1-31. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.01.019

8. Murchie EH, Lawson T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. Journal of Experimental Botany. 2013;64(13):3983-3998. doi: 10.1093/jxb/ert208

9. Mykhaylenko NF, Syvash OO, Tupik ND, Zolotareva OK. Exogenous hexoses cause quantitative changes of pigment and glycerolipid composition in filamentous cyanobacteria. Photosynthetica. 2004;42(1):105-110. doi: 10.1023/B:PHOT.0000040577.30424.d1

10. Mykhaylenko NF. The modes of glucose action on photosynthesis of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. (*Cyanophyta*) as revealed by chlorophyll fluorescence analysis. International Journal on Algae. 2005;7(3):213-227. doi: 10.1615/InterJAlgae.v7.i3.20

11. Sun X, Zhong Y, Huang Z, Yang Y. Selenium accumulation in unicellular green alga *Chlorella vulgaris* and its effects on antioxidant enzymes and content of photosynthetic pigments. PLOS One. 2014;9(11):e112270. doi: 10.1371/journal.pone.0112270

12. Vítová M, Bišová K, Hlavová M, Zachleder V, Rucki M, Čížková M. Glutathione peroxidase activity in the selenium-treated alga *Scenedesmus*

quadricauda. Aquatic Toxicology. 2011;102(1-2):87-94. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.01.003

13. Wheeler AE, Zingaro RA, Irgolic K, Bottino NR. The effect of selenate, selenite, and sulfate on the growth of six unicellular marine algae. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 1982;57(2-3):181-194. doi: 10.1016/0022-0981(82)90191-5

14. Patent of Ukraine 35582, MBI B01J 13/00, B32B 5/00, A61N 1/40, H01J 19/00. Method of obtaining the hydrated and carbonated nanoparticles "electroimpulse nanotechnology of obtaining hydrated and carbonated nanoparticles". Kosinov MV, Kaplunenko VG. (UA). – N 35582; zayavl. 29.04.2008; opubl. 25.09.2008, Biul. N 18.

15. Patent of Ukraine 49050, MBI C07C 51/41, C07F 5/00, C07F 15/00, C07C 53/00, B82B 3/00. Kaplunenko-Kosinov process for the preparation of carboxylates using nanotechnology. Kosinov MV, Kaplunenko VG. (UA). – N 49050; zayavl. 23.11.2009; opubl. 12.04.2010, Biul. N 7.

Стаття надійшла до редакції 25.03.2016 р.

DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.2(34).70749

УДК 541.13.620.193.8

Д.Р. Абдулина, Л.М. Пуриш, Л.Г. Асауленко, Г.А. Иутинская

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, 03143, Киев, Украина,
тел.: +38(044) 526 34 79, e-mail: adara@ukr.net

СУЛЬФИДОГЕННЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ТЕХНОГЕННО ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ГРУНТОВ

Сульфидогенные микробные сообщества играют важную роль в биогеохимических процессах, а также являются одними из основных агентов биокоррозии в техногенных средах. ***Цель работы -*** *исследование в грунтах при различных эколого-техногенных условиях сульфидогенных микробных сообществ и оценка связей в них.* ***Методы.*** *Микробиологические, физико-химические, статистические, в частности, факторный анализ с использованием метода главных компонент.* ***Результаты.*** *Показано, что экотопы техногенно трансформированных грунтов по сравнению с контрольными (залежными грунтами) характеризуются более широким диапазоном численности сульфатредуцирующих, железовосстанавливающих, и денитрифицирующих бактерий. Из изученных 12 переменных выделены 5 главных компонент, описывающих 76% вариаций в сульфидогенных сообществах, которые сгруппированы в 4 кластера.* ***Выводы.*** *Применение факторного анализа позволило выделить наиболее значимые переменные, влияющие на сульфидогенные микробные сообщества в грунтах: количество сульфатредуцирующих, железовосстанавливающих, аммонифицирующих, азотфиксирующих, денитрифицирующих бактерий, а также pH грунтов, температура отбора и содержание растворимых сульфатов.*

Ключевые слова: метод главных компонент, сульфидогенное микробное сообщество, техногенно-трансформированные грунты.

В составе сульфидогенного сообщества развиваются и взаимодействуют бактерии различных физиологических групп: сульфатредуцирующие, тионовые, денитрифицирующие, аммонифицирующие, свободноживущие азот-фиксирующие, железобактерии и некоторые другие, но доминирующими являются сульфатредуцирующие бактерии [9, 12, 15].

Сульфидогенные микробные сообщества присутствуют во многих техногенных и природных экотопах, например, подземных пластовых водах [4], высокотемпературных нефтяных пластах [2] и прочее [9]. Выполняя важные биосферные функции трансформации соединений серы и железа, данные сообщества являются одним из агентов биокоррозионных процессов.

Микробиологические исследования техногенных регионов показали, что состав и соотношение отдельных компонентов сульфидогенного микробного

сообщества являются важными критериями оценки коррозионной активности среды [9, 12], в связи с чем актуальной задачей является микробиологический мониторинг сульфидогенных микробных сообществ различных экотопов, находящихся под воздействием техногенной нагрузки. На сегодня в литературе мало работ, посвященных изучению количественных критериев оценки функциональных связей в микробных сообществах. Такие возможности предоставляет используемый в биологии факторный анализ, применимый для характеристики функциональных систем сложной многокомпонентной организации.

Исходя из этого, целью работы было исследование распространения в грунтах бактерий сульфидогенных микробных сообществ, при различных эколого-техногенных условиях, а также анализ полученных переменных для оценки связей между ними в сообществах с использованием факторного анализа.

Материалы и методы

Объекты исследования. Отбор образцов почв проводили в техногенно трансформированных и природных контрольных экотопах. К техногенным экотопам были отнесены грунты вблизи газопроводов «Союз» (Карпаты, Ивано-Франковская область), «Ефремовка-Диканька» (Полтавская область), «Ананьев-Тирасполь-Измаил» (Одесская область), в зоне прокладки линий метрополитена (г. Киев), а также в промышленной зоне, на полигоне захоронения отходов химического предприятия «Ориана-Галев» (г. Калуш, Ивано-Франковская область). К природным, контрольным экотопам были отнесены залежные грунты, не находящиеся в сельскохозяйственном использовании и не подвергавшиеся техногенной нагрузке, в указанных выше регионах, в Ивано-Франковской, Полтавской, Одесской и Киевской областях.

Отбор образцов грунтов проводили в весенне-летний период, температура в период отбора образцов варьировала от 8–12 °С до 25–32 °С. Образцы в стерильных флаконах и пакетах до рассева хранили при +4°С.

Физико-химические исследования. Грунтовую вытяжку для проведения физико-химических анализов грунтовых образцов готовили по стандартной методике. Значения pH грунтовой вытяжки определяли с использованием иономера универсального ЕВ-74, содержание общих растворимых сульфатов по методике с осаждением раствора хлорида бария, на фотометре КФК-3. Влажность грунта определяли по потере веса при высушивании при 105 °С до постоянной массы образца [8].

Микробиологические исследования. Определение количества бактерий в образцах проводили методом предельных разведений. Наиболее вероятное число микроорганизмов в единице объема рассчитывали по таблице Мак-Креди [14]. Количество сульфатредуцирующих бактерий определяли в жидкой питательной среде Постгейта «В» [6], железовосстанавливающих – в среде Калиненко, денитрифицирующих – в среде Гильтая, тионовых – в среде Бейеринка, аммонифицирующих – в мясо-пептонном бульоне, свободноживущих азотфиксирующих бактерий – в среде Виноградского [14]. Посевы инкубировали стационарно в течение 5–15 суток при 28 °С.

Накопительные культуры сульфатредуцирующих бактерий получали путем посева образцов в среду Постгейта «В» с лактатом натрия.

Продуцирование сероводорода определяли в среде культивирования сульфатредуцирующих бактерий (7–10 суток) по общепринятому методу йодометрического титрования.

Факторный анализ полученных результатов проводили методом главных компонент (Principal Component Analysis - PCA) [3, 11, 13]. Факторный анализ полученного массива данных проводили с использованием пакета программ Statistika v.10.0 (http://www.statsoft.com/) и Mathlab v. 6.0.

Результаты и обсуждение

Сульфатредуцирующие бактерии в процессе диссимиляционного восстановления используют сульфаты как акцептор электронов, при этом активность процесса может зависеть от грунтовых условий, в частности кислотности и наличия влаги. В связи с этим мы определяли такие параметры как значения pH, влажности и содержание растворимых сульфатов (табл. 1).

Значения pH вытяжки грунтовых образцов отобранных из техногенно-трансформированных участков колебались в пределах от нейтральных до слабощелочных (6,8–8,9). Содержание сульфатов, основного акцептора электронов для сульфатредуцирующих бактерий, в большинстве исследованных образцов, колебалось в пределах 0,55–1,95 мг/г грунта, однако в некоторых грунтах, например, в зоне газопровода в Полтавской области, содержание сульфатов было высоким − до 4,80 мг/г грунта, а в зоне строительства метрополитена, наоборот – низким (0,13–0,59 мг/г грунта). Самым низким содержанием сульфатов характеризовались контрольные грунты Киевской области (менее 0,001 мг/г).

Несколько отличались по характеристике грунты на полигоне захоронения гексахлорбензола – они были кислыми (pH 4,9–6,5), а содержание растворимых сульфатов достигало 4,4 мг/г грунта. Образцы грунтов, отобранные в контрольных зонах этой же области были слабо-кислыми (pH 6,25), количество сульфатов не превышало 0,24 мг/г грунта.

В результате микробиологического анализа отобранных образцов грунтов определено количество бактерий основных физиологических групп, входящих в состав сульфидогенных микробных сообществ: сульфатредуцирующих, тионовых, железовосстанавливающих, денитри-фицирующих, аммонифицирующих и азотфиксирующих бактерий (рис. 1).

В условиях техногенной нагрузки по сравнению с контрольными экотопами диапазоны численности сульфатредуцирующих, железовосстанавливающих и денитрифицирующих бактерий значительно расширялись, а тионовых, азотфиксирующих и аммонифицирующих бактерий – изменялись незначительно.

Известно, что наиболее интенсивные процессы микробной коррозии наблюдаются в глинистых грунтах с нейтральным pH, низким окислительно-восстановительным потенциалом и высокой численностью сульфатредуцирующих бактерий [9]. Распространённые в грунтах такого типа сульфидогенные

Таблица 1

Характеристика образцов грунтов, отобранных в разных экотопах

Table 1

Characteristic of soil samples from different ecotopes

Место отбора		Образец	Глубина отбора, м	Влажность, %	pH	Содержание растворимых сульфатов, мг/г почвы
Техногенные экотопы	Газопровод «Союз», Ивано-Франковская обл.	К1	0,8	20,0	6,8	1,42
		К2	1,0	23,0	7,2	0,80
	Газопровод «Ефремовка-Диканька», Полтавская обл.	П3	0,8	18,36	8,4	0,90
		П4	1,0	22,90	7,45	4,80
		П5	1,5	30,08	8,8	0,90
		П7	1,0	12,88	8,9	1,15
	Магистральный газопровод «Ананьев-Тирасполь-Измаил», Одесская обл.	ТТ1	1,0	5,24	8,0	0,55
		ТТ3	1,5	29,59	6,8	1,95
		ТТ4	0,8	25,72	7,5	0,82
		ТТ5	1,0	26,6	7,9	0,64
	Зона прокладки линии метрополите-на, г. Киев	ГМ1	0,3-0,4	9,57	7,65	0,13
		ГМ2	1,5	9,87	7,6	0,23
		ВМ1	0,3-0,4	9,56	7,8	0,48
		ВМ2	1,5	11,24	7,5	0,59
	Полигон захо-ронения хими-ческих отходов Ивано-Франковская обл.	ІФ2	0,05-0,10	9,19	4,9	0,55
		ІФ3	0,05-0,1	15,27	6,5	4,40
Природные экотопы	с. Диканька, Полтавская обл.	П9	0,5	17,09	8,45	1,24
		П10	0,5	22,68	8,7	0,93
	г. Измаил, Одесская обл.	ТТ6	1,5	30,38	7,4	1,30
		ТТ7	1,0	22,78	7,6	0,80
	с. Новые Петровцы, Киевская обл.	НП	1,5	20,5	7,2	0,001
	с. Бугаевка, Киевская обл.	БУГ1	1,5	20,88	7,25	0,001
		БУГ2	0,3-0,5	26,67	7,35	0,001
	с. Верхнее, Ивано-Франковская обл.	ІФ1	0,05-0,1	13,3	6,25	0,24

сообщества могут изменять свои свойства от потенциально опасных до коррозионно агрессивных. Характерной чертой этих изменений является возрастание метаболической активности сульфидогенных микробных сообществ, в частности, увеличение продуцирования сероводорода, одного из факторов, ускоряющих процессы коррозии. Учитывая это, целесообразно было определить выделение сероводорода накопительными культурами сульфатредуцирующих бактерий, выделенными из изучаемых грунтов.

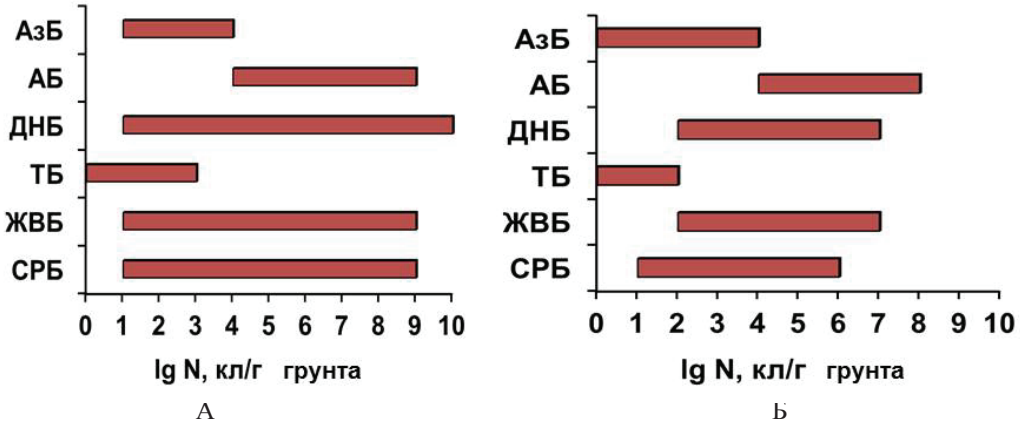


Рис. 1. Численность эколого-трофических групп бактерий сульфидогенного микробного сообщества в грунтах техногенных (А) и природных (Б) экотопов

Примечания: СРБ - сульфатредуцирующие, ЖВБ - железовосстанавливающие, ТБ - тионовые, ДНБ – денитрифицирующие, АБ – аммонифицирующие, АзБ – азотфиксирующие бактерии.

Fig. 1. Amount of the bacterial ecological trophic groups of sulfidogenic microbial community from soils in technogenically transformed (A) and natural control (B) ecotopes

Notes: SRB – sulfate-reducing, IRB – iron-reducing, TB – thionic, DNB denitrifying, AB – ammonifying, NFB – nitrogen-fixing bacteria.

В культуральной жидкости сульфатредуцирующих бактерий, выделенных из грунтов, прилегающих к газопроводам в Карпатах, Полтавской и Одесской областях обнаружено 300–360 мг/л сероводорода, что существенно не отличалось от показателей накопительных культур из контрольных грунтов (300–340 мг/л) тех же областей (рис. 2).

Активность накопительных культур, выделенных из полигона захоронения химических отходов, была невысокой – 270 мг/л сероводорода, тогда как в продуцирование сероводорода культурами из контрольных грунтов того же региона было больше на 37–40%. По-видимому, в данном случае наблюдалось ингибирование микробной активности токсическими отходами химического производства.

Наибольшее количество сероводорода (до 410 мг/л) продуцировали накопительные культуры, выделенные из грунтов зоны прокладки туннеля

метрополитена, что может косвенно свидетельствовать о потенциальной коррозионной активности этого микробного сообщества. Накопительные культуры бактерий из контрольных грунтов Киевской области продуцировали сероводород в 2 раза меньше.

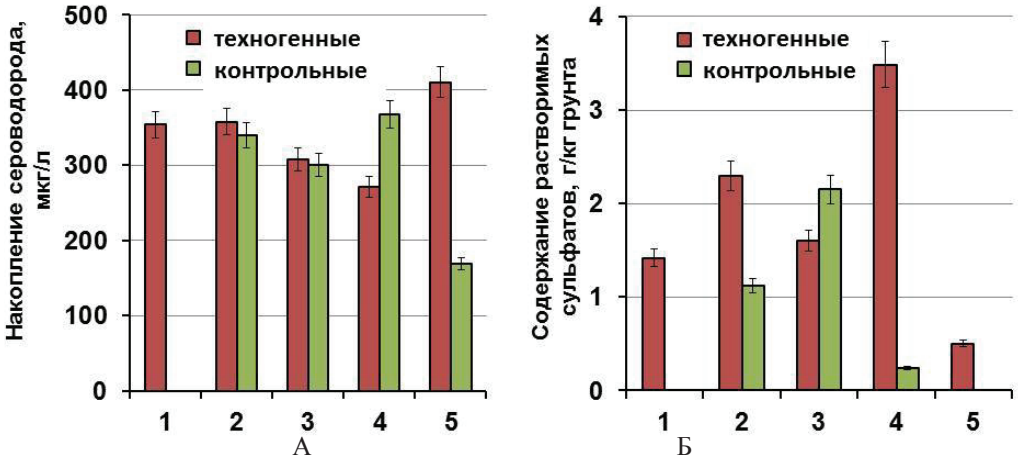


Рис. 2. Продуцирование сероводорода накопительными культурами сульфатредуцирующих бактерий (А) и содержание растворимых сульфатов (Б) в грунтах

Примечания: 1 - газопровод «Союз», Карпаты, 2 - газопровод «Ефремовка-Диканька», Полтавская обл.; 3 – газопровод «Ананьев-Тирасполь-Измаил», Одесская обл.; 4 - полигон захоронения отходов химического предприятия, Ивано-Франковская обл.; 5 - зона прокладки линии метрополитена, г. Киев.

Fig. 2. Hydrogen sulfide production by enrichment cultures of the sulfate-reducing bacteria(A) and contain of soluble sulfates (B) in soils

Notes: 1 – gas main “Soyuz”, the Carpathians mountains, gas main “Efremovka-Dykan’ka”, Poltavsky region, 3 – gas main “Ananyev-Tiraspol’-Izmail”, Odessky region, 4 – landfill dumping waste of chemical company, Ivano-Frankovsky region,
5 – underground line tunnels laying area, Kiev.

Как указывали выше, сульфаты являются акцептором электронов для сульфатредуцирующих бактерий, поэтому важно было определить их содержание и сравнить с продуцированием сероводорода, как конечного продукта метаболизма исследуемых бактерий. Усредненные значения содержания сульфатов для исследованных техногенных и контрольных экотопов были различными. В техногенно трансформированных экотопах (зоны газопровода в Полтавской области, прокладки линии метрополитена и полигон захоронения отходов химического предприятия) количество растворимых сульфатов превышало таковое в соответствующих образцах контрольных грунтов.

Полученные результаты свидетельствуют, что исследованные нами экотопы значительно отличались как по условиям существования, так и по количественным характеристикам микробных сообществ.

Для анализа связей между численностью микроорганизмов различных эколого-трофических групп сульфидогенного сообщества и некоторыми экологическими параметрами среды их существования нами был проведен факторный анализ методом главных компонент (Principal Component Analysis – PCA).

В исходную матрицу полученных нами переменных были включены такие параметры грунтов как глубина отбора, влажность, pH и содержание растворимых сульфатов в почве, температура в период отбора, а также микробиологические показатели, характеризующие численность бактерий эколого-трофических групп и продуцирование сероводорода накопительными культурами. Главные компоненты, характеризующие влияние переменных на микробные сообщества грунтов, приведены в таблице 2. Наиболее значимыми выделены главные компоненты с собственными значениями (eigenvalue) превышающими 1.

Таблица 2

Характеристика главных компонент и их объяснённая вариация

Table 2

Characteristic of the principal components and their explained variation

Факторы среды	Главные компоненты				
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Глубина отбора	–*	–	–	–	–
Температура отбора	–	–	-0,60	–	–
Влажность	–	–	–	–	0,41
pH	–	-0,42	–	–	-0,40
Содержание растворимых сульфатов	–	–	-0,54	–	–
Продуцирование сероводорода	–	–	–	–	-0,63
Сульфатредуцирующие бактерии	–	–	–	0,72	–
Железовосстанавливающие бактерии	0,58	–	–	–	–
Тионовые бактерии	–	–	–	–	–
Денитрифицирующие бактерии	–	-0,43**	–	–	–
Аммонифицирующие бактерии	0,59	–	–	–	–
Азотфиксирующие бактерии	–	-0,51	–	–	–
Объясненная вариация, %	21,5	18,5	14,1	11,4	10,5
Собственные значения	2,58	2,21	1,68	1,36	1,24

Примечание: * «–» означает, что нагрузка данного фактора незначительна и составляет менее 0,4; ** - отрицательные значения компонент указывают на положение точки в системе координат главных компонент (PC).

Notes: * «–» means that load of certain factor is insignificant and less than 0.4; ** - negative values of the components indicate the dots position in principal components coordinate system.

Для проанализированной системы с 12 переменными, по значениям объяснённой дисперсии выявлено 5 главных компонент, объясняющих до 76% вариаций. Первая главная компонента (PC1), куда вошли такие переменные как количество железовосстанавливающих и аммонифицирующих бактерий объясняет до 21,5% вариации. Вторая главная компонента (PC2) объясняет 18,5% вариаций и содержит такие переменные как pH, количество азотфиксирующих и денитрифицирующих бактерий. Третья компонента (PC3) объясняет до 14,1% вариаций, нагрузку на неё осуществляют температурный фактор и содержание растворимых сульфатов. Численность сульфатредуцирующих бактерий объясняет до 11,4% вариаций (компонента PC4). Исключение составляет переменная «количество сульфатвосстанавливающих бактерий», для которой величина нагрузки на PC4 составила 0,72, а потому с высокой степенью вероятности можно говорить о важной роли этих бактерий в сульфидогенном сообществе.

Следовательно, переменными, объясняющими вариации в исследуемых сообществах, являются: количество сульфатредуцирующих, железовосстанавливающих, аммонифицирующих, азотфиксирующих, денитрифицирующих бактерий, а также pH грунтов, температура отбора и содержание растворимых сульфатов.

График распределения нагрузок визуализирует роль исследуемых переменных сульфидогенных сообществ и степень их зависимости друг от друга, отражает выявленные связи между переменными в сообществе (рис. 3).

На графике исследованные переменные сформировали четыре группы (кластеры). В кластер I вошли такие параметры грунтов как влажность и глубина отбора. Отдельным кластером II выделяется группа, в которую входят численность азотфиксирующих, денитрифицирующих бактерий и pH. Кластер III объединяет такие показатели как содержание сульфатов, температура, количество сульфатредуцирующих бактерий и продуцирование сероводорода. Это подтверждает основные физиологические и экологические функции сульфидогенного микробного сообщества, развитие которого в значительной степени зависит от наличия сульфатов, а результатом его жизнедеятельности является продуцирование сероводорода. Также наблюдается взаимосвязь между количеством аммонифицирующих и железовосстанавливающих бактерий (кластер IV).

По данным проведённого анализа тионовые бактерии не были включены в кластер с сульфатредуцирующими бактериями и содержанием сульфатов. Мы предполагаем, что относительно слабые связи между тионовыми и сульфатредуцирующими бактериями в гетерогенной грунтовой среде обусловлены тем, что эти бактерии локализованы соответственно в аэробных и анаэробных зонах, которые функционально и пространственно разделены между собой. В водных средах данная взаимосвязь может проявляться сильнее [5, 7].

Значения объясненной дисперсии были невысокими и колебались в пределах 10,4–21,5%. Следует, однако учитывать, что микробное сообщество грунта – это многокомпонентная система, на которую оказывает влияние комплекс

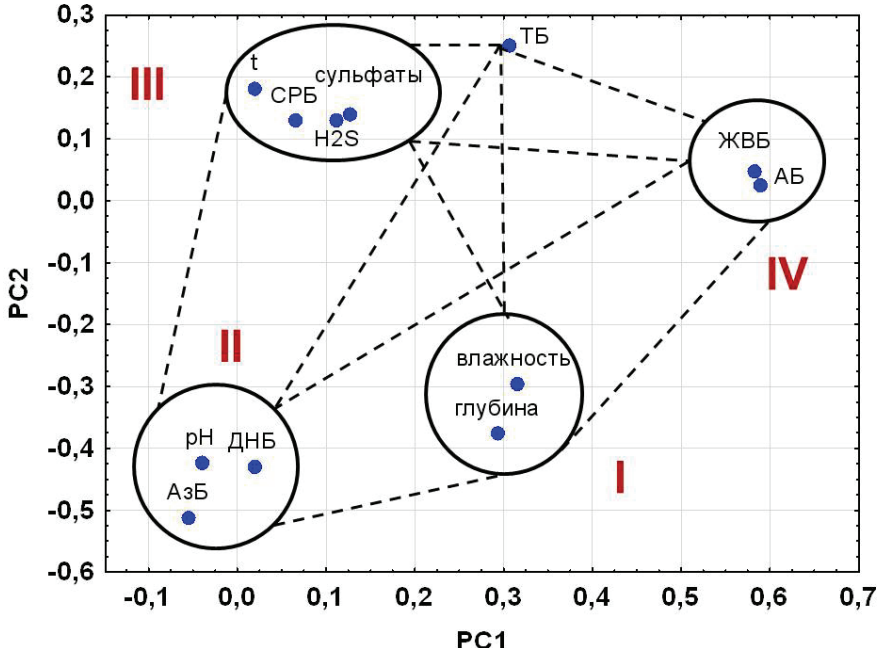


Рис. 3. Распределение исследуемых физико-химических и микробиологических параметров по величине их нагрузки для главных компонент PC1 и PC2

Примечания: СРБ – сульфатредуцирующие, ЖВБ – железовосстанавливающие, ТБ – тионовые, ДНБ – денитрифицирующие, АзБ – азотфиксирующие, АБ – аммонифицирующие бактерии, H_2S – продуцирование сероводорода.

Fig. 3. Loadings plot of the physicochemical and microbiological parameters in the two dimensional PC1-PC2 subspace

Notes: SRB – sulfate-reducing, IRB – iron-reducing, TB – thionic, DNB denitrifying, AB – ammonifying, NFB – nitrogen-fixing bacteria, H_2S – hydrogen sulfide production.

факторов, среди которых были не учтенные в наших исследованиях: тип почвы, её механический состав, содержание гумуса, наличие питательных веществ и прочее. В данной работе мы ограничились только изучением микроорганизмов сульфидогенных сообществ, и не учитывали их взаимодействие с микроорганизмами других эколого-физиологических групп. Кроме того, были отобраны образцы различных типов грунтов. Указанные причины могут объяснить невысокие значения дисперсии, хотя применение данного анализа для нашего массива данных позволило выявить главные компоненты, объясняющие 76% вариаций.

Также можем отметить, что для экологических систем выявляемые главные компоненты зачастую могут содержать много переменных, что было показано, в частности, для щелочных озерных экотопов [1, 11].

Результаты анализа исследованных нами грунтовых экосистем показали, что естественные связи в микробных сообществах грунтов вполне подтверждают теоретическую трофическую схему сульфидогенного сообщества с

так называемым бактериальным окислительным фильтром, предложенную Г.А. Заварзиным [10]. Структура выявленных нами связей напоминает пятичленную плеяду типа «сетка-звезда», хотя и несколько несимметричную, что возможно объясняется или нарушенностью связей в сообществе, или недостаточным массивом собранных данных [1, 11–13].

Построенные графики (рис. 4) в двухмерной системе координат дали возможность провести анализ исследуемых экотопов исходя из их физико-химических характеристик. В кластере I объединены грунтовые образцы, отобранные вблизи газопроводов «Союз», Ивано-Франковская обл. (точки К1, К2), «Ефремовка-Диканька», Полтавская обл. (точки П3, П7, П9, П10) и «Ананьев-Тирасполь-Измаил», Одесская обл. (точки ТТ3, ТТ4, ТТ5). В кластер II, в основном, вошли почвенные образцы из недавно техногенно трансформированных экотопов зоны строительства линий метрополитена (точки ГМ1, ГМ2, ВМ1, ВМ2). Образцы из контрольных грунтов природных экотопов объединились в кластер III (точки НП, Буг1, Буг2). Отдельно на графике выделяется кластер IV, куда вошли образцы грунтов экстремального экотопа захоронения отходов химического предприятия (точки ІФ1, ІФ2 и ІФ3). Такое разделение образцов грунтов также может быть связано с тем, что грунты, отобранные из различных географических областей, имеют свои характеристики, влияющие на сообщества.

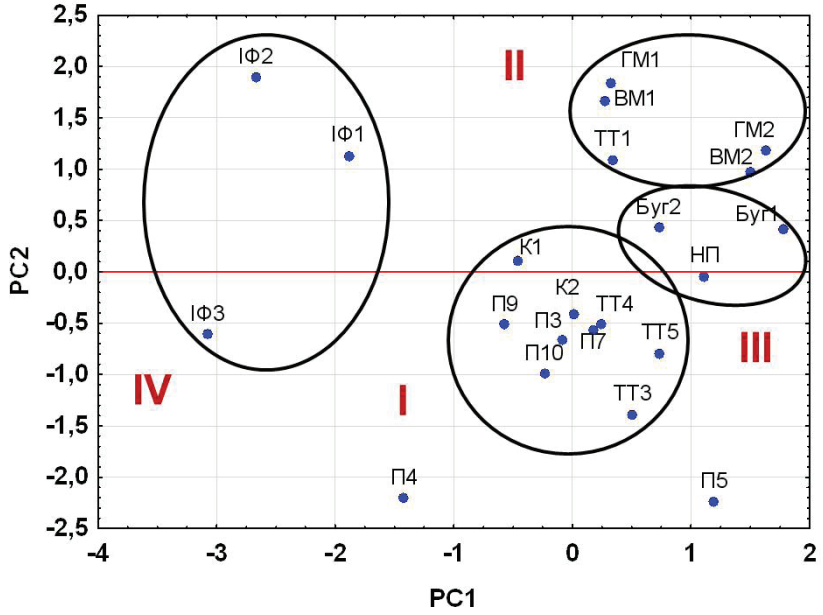


Рис. 4. Распределение образцов грунтов по величинам математических счетов, полученных для главных компонент PC1 и PC2

Примечание: обозначения точек соответствует образцам грунтов в табл. 1.

Fig. 4. Score plot of the soil samples in the two dimensional PC1-PC2 subspace

Notes: dots designations are correspond to soil samples pointed in Table 1.

Таким образом, проведенные исследования, выявили, что техногенно трансформированные экотопы по сравнению с природными, характеризуются более широким диапазоном численности сульфатредуцирующих, железовосстанавливающих, и денитрифицирующих бактерий. В результате использования факторного анализа методом главных компонент были выделены переменные, объясняющие 76% вариаций в сульфидогенных микробных сообществах. Применение факторного анализа в почвенной экологии позволяет определить наиболее значимые переменные, влияющие на функционирование и структуру связей между отдельными компонентами микробных сообществ различных экотопов.

Авторы выражают благодарность к.т.н. Кирпатенко И.Н. (Институт возобновляемой энергетики НАН Украины) за помощь в статистической обработке данных.

УДК 541.13.620.193.8

Д.Р. Абдуліна, Л.М. Пуріш, Л.Г. Асауленко, Г.О. Іутинська
Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, 03143, Київ, Україна,
тел.: +38(044) 526 34 79, e-mail: adara@ukr.net

СУЛЬФІДОГЕННІ МІКРОБНІ УГРУПОВАННЯ ТЕХНОГЕННО-ТРАНСФОРМОВАНИХ ГРУНТІВ

Реферат
Сульфідогенні мікробні угруповання відіграють важливу роль у біогеохімічних процесах, також є одним із основних агентів біокорозії у техногенних середовищах. ***Мета роботи*** *– дослідження у ґрунтах за різних еколого-техногенних умов сульфідогенних мікробних угруповань та оцінка зв'язків у них.* ***Методи.*** *Мікробіологічні, фізико-хімічні, статистичні, зокрема факторний аналіз з використанням методу головних компонент.* ***Результати.*** *Показано, що екотопи техногенно трансформованих ґрунтів порівняно з контрольними характеризуються більш широким діапазоном чисельності сульфатвідновлювальних, залізовідновлювальних та денітрифікувальних бактерій. Із 12-ти вивчених змінних, які згруповано у 4 кластери, виділено 5 головних компонент, що описують до 76% варіацій у сульфідогенних мікробних угрупованнях.* ***Висновки.*** *Використання факторного аналізу дозволило виділити найбільш значущі змінні, які впливають на сульфідогенні мікробні угруповання у ґрунтах: кількість сульфатвідновлювальних, залізовідновлювальних, амоніфікувальних, азотфіксувальних, денітрифікувальних бактерій, а також pH ґрунтів, температура відбору та вміст розчинних сульфатів.*

Ключові слова: метод головних компонент, сульфідогенне мікробне угруповання, техногенно-трансформовані ґрунти.

UDC 541.13.620.193.8

D.R. Abdulina, L.M. Purish, L.G. Asaulenko, G.A. Iutynska
D.K. Zabolotny Institute of microbiology and virology of NAS of Ukraine,
154, Zabolotny str., 03143, Kyiv, Ukraine,
tel.: +38(044) 526 34 79, e-mail: adara@ukr.net

SULFIDOGENIC MICROBIAL COMMUNITIES FROM TECHNOGENICALLY TRANSFORMED SOILS

Summary
Sulfidogenic microbial communities play a significant role in biogeochemical processes, as well they are one of the biocorrosive relevant agents in man-caused ecotopes. ***Aim of the study*** *– to investigate the sulfidogenic microbial communities in the soils under different ecological technogenic conditions.* ***Methods.*** *Microbiological, physical chemical and statistical in particular principal component analysis.* ***Results.*** *It is shown that soil from technogenically tranfssormed ecotopes had increasing amount range of sulfate-reducing, iron-reducing and denitrifying bacteria then ones from natural control ecotopes. From 12 studied factors, which were clustered to 4 groups it was identified 5 principal components, described up to 76% of the variations in sulfidogenic microbial communities.* ***Conclusions****. The usage of principal components analysis allowed describing the most significant factors which has an influence on the sulfidogenic microbial communities, i.e. quantities of the sulfate-reducing iron-reducing, ammonifying, nitrogen-fixing and denitrifying bacteria, as well as pH, temperature and contain of soluble sulfates.*

Key words: principal component analysis, sulfidogenic microbial community, technogenically transformed soils.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Eiler A., Farnleitner A.H., Zechmeister T.C., Herzig A., Hurban C., Wesner W., Krachler R., Velimirov B., Kirschner A.K.T.* Factors controlling extremely productive heterotrophic bacterial communities in shallow soda pools // Microbiol. Ecol. - 2003. - 46. - P. 43–54.

2. *Guan J., Zang B.-L., Mbadinga S. M., Liu J.-F., Gu J.-D., Mu B.-Z.* Functional genes (*dsr*) approach reveals similar sulphidogenis procaryotes diversity but different structure in saline waters from corroding high temperature petroleum reservoirs // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. - 98. – P. 1871-1882.

3. *Hubert M. Engelen S.* Robust PCA and classification in biosciences. // Bioinformatics. – 2004. – 20, № 11. - P. 1728-1736.

4. *Nazina T.N., Shestakova N.N., Grigor'yan A.A., Mikhailova E.M., Tourova T.P., Poltaraus A.B., Feng C., Ni F., Belyaev S.S.* Phylogenetic diversity and activity of anaerobic microorganisms of high-temperature horizons of the Dagang Oil Field (P.R. China) // Mikrobiologiya. – 2006. – 75, № 1. – P. 55-66.

5. *Pimenov N.V., Zakharova E.E., Bryukhanov A.L., Koreeva V.A., Kuznetsov B.B., Tourova T.P., Pogodaeva T.V., Kalmychkov G.V., Zemskaya T.I.* Ac-

tivity and structure of the sulfate-reducing bacterial community in the sediments of the Southern part of Lake Baikal // Mikrobiologiya. – 2014. – 83, № 2. – P. 180-190.

6. *Postgate J. R.* The sulphate-reducing bacteria. Cambridge: University Press. - 1984. - 208 p.

7. *Tonola M., Peduzzi S., Demarta A. et al.* Phototropic sulfur and sulfate-reducing bacteria in the chemocline of meromictic Lake Cadagno, Switzerland // J. Limnol. – 2004. – 63, № 2. – P. 161-170.

8. *Александрова Л.Н., Найденова О.А.* Лабораторно-практические занятия по почвоведению. Ленинград: Колос. - 1976. – 280 с.

9. *Андреюк К.І., Козлова І.П., Коптєва Ж.П., Піляшенко-Новохатній А.І., Заніна В.В., Пуріш Л.М.* Мікробна корозія підземних споруд. Київ: Наукова Думка. - 2005. – 258 с.

10. *Заварзин Г.А.* Лекции по природоведческой микробиологии. Москва: Наука. – 2003. – 348 с.

11. *Зайцева С.В. Абидуева Е.Ю., Бурюхаев С.П., Намсараев Б.Б.* Факторы, контролирующие активность микробного сообщества в щелочном озере Белое (Забайкалье) // Микробиология. – 2012. – 81, № 4. – С. 508-516.

12. *Иутинская Г.А., Пуриш Л.М., Абдулина Д.Р.* Коррозионно активные микробные сообщества техногенных экотопов. Изд-во «Ламберт». –2014.-173 с.

13. *Кожевникова М.Ф., Левенец В.В., Диордица В.А., Ролик И.Л., Щур А.А.* Хемометрический подход к обработке данных, полученных в результате использования ядерно-физических методов анализа вещества // Складні системи і процеси. – 2008. – № 1. – С. 48-54.

14. *Практикум по микробиологии*. / под ред. А.И. Нетрусова. Москва: Издательский центр «Академия». – 2005. – 608 с.

15. *Пуріш Л.М., Асауленко Л.Г.* Динаміка сукцесійних змін у сульфідогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі // Мікробіологічний журнал. – 2007. – Т. 69, № 6. – С. 19-25.

References

1. Eiler A, Farnleitner A, Zechmeister T, Herzig A, Hurban C, Wesner W, Krachler R., Velimirov B, Kirschner A. Factors controlling extremely productive heterotrophic bacterial communities in shallow soda pools. Microbiol. Ecol. 2003; 46:43–54.

2. Guan J, Zang BL, Mbadinga SM, Liu JF, Gu JD, Mu BZ. Functional genes (*dsr*) approach reveals similar sulphidogenis procaryotes diversity but different structure in saline waters from corroding high temperature petroleum reservoirs. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014; 98:1871-1882.

3. Hubert M, Engelen S. Robust PCA and classification in biosciences. Bioinformatics. 2004; 20(11):1728-1736.

4. Nazina TN, Shestakova NN, Grigor'yan AA, Mikhailova EM, Tourova TP, Poltaraus AB, Feng C, Ni F, Belyaev SS. Phylogenetic diversity and activity of an-

aerobic microorganisms of high-temperature horizons of the Dagang Oil Field (P.R. China). Microbiology (Mikrobiologiya). 2006; 75(1):55-66.

5. Pimenov NV, Zakharova EE, Bryukhanov AL, Koreeva VA, Kuznetsov BB, Tourova TP, Pogodaeva TV, Kalmychkov GV, Zemskaya TI. Activity and structure of the sulfate-reducing bacterial community in the sediments of the Southern part of Lake Baikal. Microbiology(Mikrobiologiya). 2014; 83(2):180-190.

6. Postgate JR The sulphate-reducing bacteria. Cambridge: 1984; 208p.

7. Tonola M, Peduzzi S, Demarta A. Phototropic sulfur and sulfate-reducing bacteria in the chemocline of meromictic Lake Cadagno, Switzerland. Journal Limnol. 2004; 63(2):161-170.

8. Alexandrova LN, Naydenova OA. Pedology laboratory practical classes. Leningrad: 1976. 280p.

9. Andreyuk EI, Kozlova IA, Kopteva ZhP, Pilyashenko-Novokhatny AI, Zanina VV, Purish LM. Microbial corrosion of underground structures. Kyiv: Naukova Dumka; 2005. 260p.

10. Zavarzin GA. Environmental microbiology lectures. Moscow: Nauka; 2004. 348p.

11. Zaitseva SV, Abidueva EYu, Buryukhaev SP, Namsaraev BB. Factors controlling the activity of the microbial community of the alkaline lake Beloe (Transbaikal region). Microbiology (Mikrobiologiya). 2012; 81(4):468–476.

12. Iutynska GA, Purish LM, Abdulina DR. Corrosive-relevant sulfidogenic microbial communities of man-caused ecotopes. Lambert Academic Publishing; 2014. 173p.

13. Kozhevnikova MF, Levenets' VV, Diorditsa VA, Rolyk IL, Schur AA. Chemometric approach to processing data obtained from using of nuclear-physical methods of substances analysis. Skladni systemy i protsesy. 2008; 1:48-54.

14. Netrusov AI, Egorova MA, Zakharchuk LM. Practice in microbiology. Moscow: Academia Publishing; 2005. 608p.

15. Purish LM, Asaulenko LG. Dynamics of successive changes in sulphidogenic microbial association under the conditions of formation of the biofilm on steel surface. Mikrobiol. Zhurn. 2007; 69(6):19-25.

Стаття надійшла до редакції 25.03.2016 р.

DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.2(34).70747

УДК57. 082. 25

І.Л. Гармашева

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. академіка Заболотного, 154, Київ-143, Україна, 03143,
тел.: +38 (044) 526 23 29, e-mail: inna.garmasheva@gmail.com

РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ГЕНІВ ЕНТЕРОЦИНІВ СЕРЕД ШТАМІВ ЕНТЕРОКОКІВ, ІЗОЛЬОВАНИХ З ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ ЛЮДИНИ

Мета. *Визначити наявність генів найбільш розповсюджених ентероцинів А, В і Р та порівняти спектри антагоністичної активності та наявності генів ентероцинів у штамів ентерококів, ізольованих з шлунково-кишкового тракту людей похилого віку.* ***Методи****. Полімеразна ланцюгова реакція з праймерами, специфічними до генів ентероцинів А, В і Р, та статистична обробка даних з використанням кластерного аналізу.* ***Результати****. Гени ентероцинів А, В і Р виявлено у 21 з 58 (64%) штамів ентерококів, причому у 13 штамів виявлено по два різних гени ентероцинів, а у трьох штамів – гени ентероцинів А, В і Р. Штами з вузьким спектром антагоністичної дії містили комбінації генів А/В/Р, А/В, або один з генів ентероцинів. Штами з широким спектром активності також містили від 1 до 3 генів ентероцинів. Не виявлено залежності спектру антагоністичної активності від видової належності штамів ентерококів. Наявність гену ентероцину А, комбінації генів А/В та А/В/Р були виявлені виключно у штамів виду Enterococcus faecium.* ***Висновки****. Найпоширенішими серед досліджених штамів ентерококів є ген ентероцину Р та комбінація генів А/Р. Спектр антагоністичної активності досліджених штамів не залежить від видової належності та наявності генів ентероцинів А, В і Р.*

Ключові слова: ентерококи, антагоністична активність, гени ентероцинів.

Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій щодо збудників захворювань людини і тварин добре відомі і в першу чергу вони зумовлені продукцією біологічно активних метаболітів, зокрема молочної кислоти. Антагоністична активність ентерококів здавна привертає увагу науковців з точки зору пошуку чинників антибактеріальної дії щодо умовно-патогенних та патогенних бактерій. Було показано, що ентерококи продукують бактеріоцини – так звані ентероцини, більшість з яких, згідно класифікації бактеріоцинів молочнокислих бактерій, відносяться до класу II [11]. Пізніше авторами була запропонована окрема схема класифікації ентероцинів [9], детальний огляд якої та характеристик найбільш розповсюджених ентероцинів наведені в роботі [3].

Пошук бактеріоциногенних штамів з використанням традиційних мікробіологічних методів може бути малоефективним, оскільки бактеріоцини мають

різні спектри антимікробної дії та їх продукція залежить від умов культивування [7, 8]. В останні роки поряд з мікробіологічними методами дослідження бактеріоциногенної активності вивчається наявність структурних генів ентероцинів з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Було показано, що гени ентероцинів, зокрема ентероцинів A, B, P, L50A та L50B, дуже поширені серед штамів різного походження [8,13].

На сьогоднішній день у літературі накопичені дані щодо розповсюдження генів ентероцинів, однак серед вивчених штамів переважають ті, що були ізольовані з ферментованих продуктів харчування та оточуючого середовища [8, 10, 12]. Дані щодо розповсюдження генів ентероцинів серед штамів кишкового походження, особливо ізольованих від людей похилого віку, практично відсутні. В попередній роботі нами було показано, що штами ентерококів, які були ізольовані з шлунково-кишкового тракту (ШКТ) людей довгожителів, проявляють антагоністичну активність щодо умовно патогенних мікроорганізмів. Крім того, антагоністична активність більшості штамів ентерококів залежала від складу живильного середовища [1], що дало змогу припустити про наявність бактеріоциногенних штамів. Метою роботи було визначення наявності генів найбільш розповсюджених ентероцинів A, B і P з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та порівняння даних щодо спектру антагоністичної активності та розповсюдження генів ентероцинів у штамів ентерококів, ізольованих з шлунково-кишкового тракту людей похилого віку.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були 58 штамів ентерококів видів *Enterococcus faecium* (26 штамів), *E. durans* (18 штамів), *E. hirae* (9 штамів), *E. faecalis* (2 штами) та *Enterococcus* sp. (3 штами) [2]. Бактерії вирощували на середовищі MRS (Man, Rogosa, Sharp medium) при температурі 37 °C.

Спектри антагоністичної активності ентерококів щодо референс-штамів умовно-патогенних мікроорганізмів *Pseudomonas aeruginosa* УКМ B-900 (ATCC 9027), *Proteus vulgaris* УКМ B-905 (ATCC 6896), *Escherichia coli* УКМ B-906 (ATCC 25922 (F-50)), *Bacillus cereus* УКМ B-908 (ATCC 11778), *Staphylococcus aureus* УКМ B-904 (ATCC 25923(F-49)), *S. epidermidis* УКМ B-919 (ATCC 12228), *Klebsiella pneumoniae* УКМ B-920 (ATCC 10031), *Salmonella enterica* УКМ B-921 (NCTC 6017) були вивчені в нашій попередній роботі методом відстроченого антагонізму [1]

Бактеріальну ДНК виділяли з добової культури за описаною методикою [15]. Наявність структурних генів ентероцинів визначали методом ПЛР з використанням пар праймерів:

- для гену ентероцину A entA1 (5´-GGTACCACTCATAGTGGAAA-3´) та entA2 (5´-CCCTGGAATTGCTCCACCTAA-3´) [4];
- для гену ентероцину B – entB1 (5´-AAAATGTAAAAGAATTAAGATCG-3´) та entB2 (5´-AGAGTATACATTTGCTAACCC-3´) [5];
- для гену ентероцину P – entP1(5´-GCTACGCGTTCATATGGTAAT-3´) та entP2 (5´-TCCTGCAATATTCTCTTTAGC-3´) [6].

ПЛР проводили з використанням набору реагентів «АмплиСенс® PCR» (Росія). Ампліфікацію проводили у 25 мкл реакційної суміші, що містила 10 мкл ПЛР-суміші (ПЛР-буфер, 2,2 мМ $MgCl_2$, 0,1 ОД/мкл Діа Так-полімераза), 1 мкл (0,2 мМ) суміші дезоксинуклеозидтрифосфатів, по 0,3 мкл кожного з праймерів, 5 мкл зразка ДНК. ПЛР проводили за таких умов: початкова денатурація при 94 ºС – 5 хв, 30 циклів денатурації при 94 ºС – 30 с, відпалу при 56 ºС (58 ºС для entA1 та entA2) – 30 с, елонгації при 72 ºС – 30 с, останній цикл при 72 ºС – 5 хв. Продукти ампліфікації розділяли у 1,5% агарозному гелі, забарвленому розчином бромистого етидію й візуалізували в ультрафіолетовому світлі.

Визначення нуклеотидної послідовності трьох продуктів ампліфікації, отриманих з кожною парою праймерів, проводили на генетичному аналізаторі ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США), з використанням набору BigDye®Terminator v3.1, відповідно інструкції виробника. Отримані в результаті секвенування послідовності ДНК порівнювали з послідовностями ДНК бази даних GenBank, використовуючи програму BLAST 2.2.17 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Для порівняння спектрів антагоністичної активності та наявності генів ентероцинів у досліджуваних штамів ентерококів було застосовано кластерний аналіз методом незваженого парного середнього з використанням комп'ютерної програми «Statistika 7.0» (Stat Soft, Inc. США).

Результати досліджень та їх обговорення

В результаті проведення ПЛР-аналізу у 21 з 58 (64%) досліджених нами штамів ентерококів було отримано позитивний результат хоча б з однією парою праймерів, специфічних до генів ентероцинів *entA*, *entB* чи *entP* (табл. 1). В результаті ПЛР з праймерами EntA1 і EntA2 з ДНК 16 штамів було отримано амплікони розміром 113 п.н., з праймерами EntB1 і EntB2 – амплікони розміром 173 п.н. отримано з ДНК 12 штамів, з праймерами EntP1 і EntP2 – амплікони розміром 132 п.н. отримано з ДНК 28 штамів. Отже, 22 (38%) штами ентерококів містили тільки один з трьох досліджуваних генів ентероцинів, а саме з ДНК 15 штамів був отриманий продукт ампліфікації тільки з праймером до ентероцину P, з ДНК трьох штамів – тільки з праймером до ентероцину A, з ДНК чотирьох штамів тільки з праймером до ентероцину B. У всіх інших штамів ентерококів отримані продукти ампліфікації з декількома праймерами: у 7 штамів з праймерами до ентероцинів A і P, у 3 штамів – з праймерами до ентероцинів A і B, у 3 штамів – з праймерами до ентероцинів B і P, у трьох штамів – з трьома використаними праймерами до ентероцинів A, B і P (табл. 1).

Нуклеотидні послідовності ампліконів, отриманими з ДНК штаму *E. faecium* 140Д, виявили гомологію з відповідними послідовностями генів ентероцинів A, B і P, депонованими в базі даних GenBank. Послідовність амплікону, отриманого з праймерами EntA1 і EntA2, специфічними до гену ентероцину A (AGAAGAGGAATTATTGCACTAAAATAAATGTACGGTCG

ATTGGGCCAAGGCAACTACTTGTATTGCAGGCAATGTCTATAGG TGGTTTTTTAGGTGGAGCAATTCCAGGGACC) є на 98% гомологічною

Таблиця 1

Наявність генів ентероцинів A, B і P у штамів ентерококів за результатами ПЛР-аналізу

Table 1

Presence of enterocin genes A, B and P in enterococci strains according to PCR analysis results

Вид, штам	Ген ентероцину	Вид, штам	Ген ентероцину
E. faecium 77Д	entA	*E. durans* 52Д	entP
83Д	entA	67Д	entP
84Д	-	88Д	-
87Д	-	90Д	-
103Д	-	98Д	entP
104Д	entP	97Д	-
113Д	entP	112Д	-
114Д	-	127Д	entP
118Д	entA	138Д	entP
119Д	entA, entP	142Д	entA, entP
120Д	entA, entP	146Д	entB, entP
126Д	entP	152Д	entA, entP
130Д	entB	167Д	entA, entP
131Д	entB	219Д	entP
135Д	entA, entB	285Д	-

Продовження таблиці 1

Вид, штам	Ген ентероцину	Вид, штам	Ген ентероцину
139Д	entA, entB, entP	292Д	entP
140Д	entA, entB, entP	301Д	-
141Д	entA, entB, entP	328Д	entP
148Д	entA, entB	*E. hirae* 21Д	-
161Д	-	45Д	-
214Д	entP	92Д	-
264Д	-	101Д	-
268Д	entA, entP	109Д	-
309Д	entA, entB	110Д	-
319Д	-	121Д	-
321Д	entB, entP	166Д	entB
Enterococcus sp.122Д	-	307Д	entP
192Д	entA, entP	*E. faecalis* 272Д	entB, entP
216Д	entP	276Д	entP

Примітка: «-» – гени досліджуваних ентероцинів A, B, P відступні (ПЛР-результат негативний)
Note: “-” – no genes of enterocin genes A, P, and P studied (negative PCR- result)

з послідовностями гену ентероцину А штаму *E. faecium* CWBI_B1430 (FJ161954.1). В результаті сиквенування амплікону, отриманого з праймерами, специфічними до гену ентероцину В, було отримано послідовність AA ATTAAACAAATTATCGGTGGAGAAATGATCACAGAATGCCTAATGAG TTAAATAGACCTAACAACTTATCTAAAGGTGGAGCAAAATGTGGTGC TGCAATTGCTGGGGGATTATTTGGAATCCCAAAAGGACCACTAGCAT GGGCTGCTGGGTTAGCAAATGTATACTCAT, яка є на 99% гомологічною з послідовностями гену ентероцину В штаму *E. faecium* CWBI_B1430 (код в GenBank FJ161955.1). В результаті сиквенування амплікону, отриманого з праймерами, специфічними до гену ентероцину Р, було отримано послідовність GCTACGCGTTCATATGGTAATGGTGTTTATTGTAATAATAGTAAATGCTGG GTTAACTGGGGAGGAGCTAAAGAGAATATTGCAGGAATTGTTATTAGTG GCTGGGCTTCTGGTTTGGCAGGTATGGGACAT, яка є на 100% гомологічною з послідовністю гену ентероцину Р штаму *E. faecium* LHICA 40-4 (код в GenBank FJ416487.1).

З метою порівняння спектрів антагоністичної активності досліджуваних штамів щодо умовно-патогенних тест-культур та наявності генів ентероцинів було використано кластерний аналіз, отримана дендрограма подібності наведена на рис. 1.

Двадцять дев'ять штамів (50%) мали вузький спектр активності (кластеру А), пригнічували ріст від однієї до чотирьох тест-культур УПМ, за виключенням трьох штамів ентерококів (*E. faecium* 120Д, 135Д, *E. durans* 112Д), що не виявляли антагоністичної активності. Три штами не виявляли антагоністичної активності. Слід зазначити, що штами до кластеру А, не виявляли активності щодо *E. coli*, *S. enterica* і *K. pneumoniae* (за винятком штаму *E. faecium* 103Д, який пригнічував ріст *K. pneumoniae*). Інші двадцять дев'ять досліджених штамів ентерококів виявляли більш широкий спектр дії від чотирьох до восьми тест-культур УПМ (з 8 використаних) і були об'єднані у кластер В. Як видно з наведеної дендрограми, спектр антагоністичної активності штамів ентерококів щодо УПМ не залежав від наявності генів ентероцинів А, В і Р. Штами з вузьким спектром дії (кластер А) містили комбінації генів А/В/Р (*E. faecium* 140Д, 141Д), А/В (*E. faecium* 135Д, 148Д), чи один з генів ентероцинів. Штами *E. faecium* 135Д і 112Д, які не виявляли антагоністичної дії до жодної з використаних тест-культур, містили гени ентероцинів А/В і А, відповідно. Штами з широким спектром активності (кластер Б) також містили від 1 до 3 генів ентероцинів. Слід зазначити, що комбінація генів А/Р частіше виявлялася у штамів ентерококів, віднесених до кластеру Б. Також не виявлено залежності спектру антагоністичної активності від видової належності штамів ентерококів, штами різних видів виявляли однаковий спектр активності. В той самий час, як зазначено вище, наявність гену ентероцину А, комбінації генів А/В та А/В/Р була виявлена виключно у штамів виду *E. faecium*.

Отже, в результаті проведеного дослідження виявлено структурні гени ентероцинів А, В і Р у 64% штамів ентерококів. Найпоширенішим серед до-

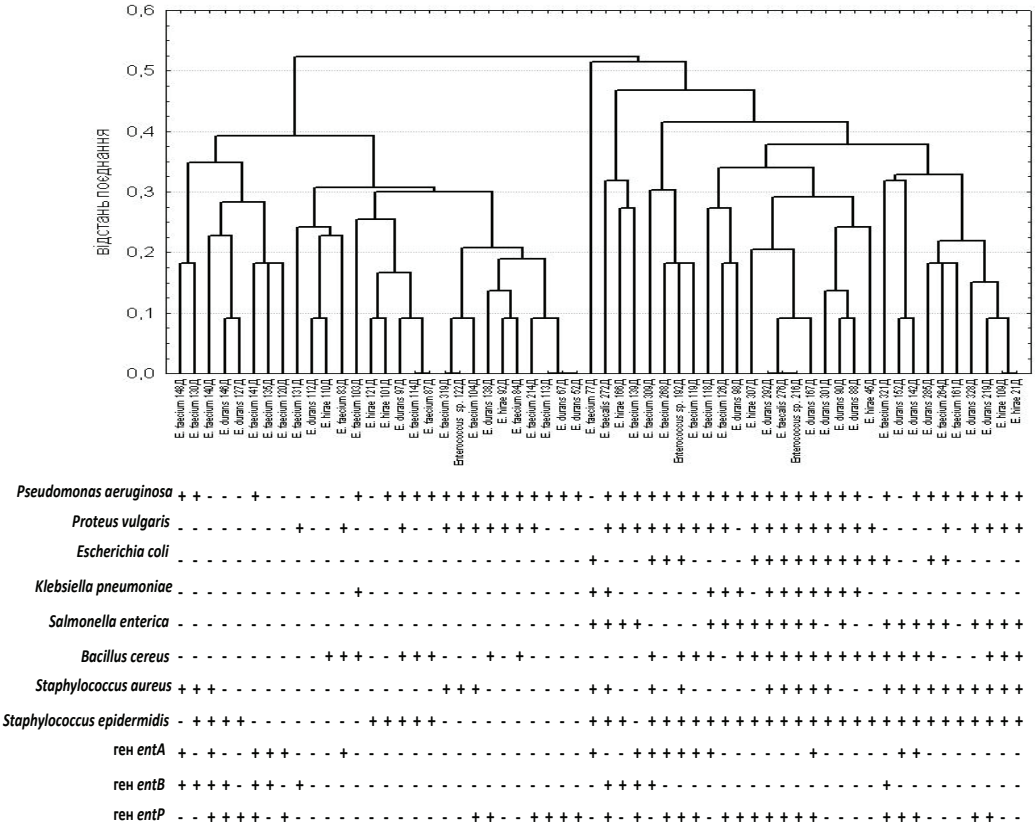


Рис. 1. Дендрограма подібності штамів ентерококів за спектром антагоністичної активності щодо тест-штамів умовно патогенних мікроорганізмів та наявності генів ентероцинів:

«+» – пригнічує ріст тест-культури/виявлено ген ентероцину; «-» – не пригнічує ріст тест-культури/не виявлено ген ентероцину;

Fig. 1. Dendrogram of similarity among enterococci strains according to the range of antagonistic activity against test strains of opportunistic microorganisms and presence of enterocin genes.

"+" – growth inhibition/gene presence; "-" – no growth inhibition/no gene presence;

сліджених штамів є ген ентероцину Р, він виявлений у 44% штамів, переважно у виду *E. durans* та комбінація генів А/Р. Не виявлено залежності між спектром антагоністичної активності щодо тест-культур УПМ і наявності структурних генів ентероцинів А, В і Р. Штами, у яких не було отримано продуктів ампліфікації з праймерами, специфічними до ентероцинів А, В чи Р, виявляли як широкий, так і вузький спектри антагоністичної активності, що може свідчити про продукцію якихось інших бактеріоцинів, чи біологічно-активних сполук з антимікробною дією. З іншого боку, відсутність антагоністичної активності у штамів, які містять структурні гени бактеріоцинів, чи різний спектр активності

у штамів, що містять ті ж самі гени, може бути зумовлено відсутністю експресії даних генів в умовах експерименту. Отримані нами дані збігаються з даними літератури стосовно розповсюдження структурних генів ентероцинів. Ентероцини А, В і Р є досить поширеними серед ентерококів різного походження [14]. Було відмічено відсутність кореляції між наявністю генів відомих ентероцинів і спектром антагоністичної активності [10, 12,13]. Показано, що штам *E. faecium* RZS C5, виділений з сиру, містить гени ентероцинів А, В і Р але пригнічує ріст виключно *Listeria monocytogenes* [12]. В той же час, у штаму *E. faecium* GM1, що пригнічував ріст *E. coli, P. vulgaris, K. pneumoniae, P. aeruginosa, S. aureus,* в результаті ПЛР аналізу виявлено тільки ген ентероцину Р [10].

Таким чином, антагоністична дія досліджених у роботі штамів ентерококів може бути зумовлена продукцією біологічно активних метаболітів, а саме бактеріоцинів чи їх комплексами. Аналіз даних літератури та отримані результати, а саме відсутність зв'язку між наявністю генів ентероцинів А, В і Р та спектром дії, дає підстави припустити, що антагоністична дія може бути зумовлена ентероцинами, наявність генів яких не вивчалася у роботі, чи іншими бактеріоциноподібними речовинами. Штами даної колекції є перспективними для подальшого дослідження з метою виділення і вивчення нових біологічно активних речовин з антимікробною дією.

Автор висловлює подяку старшому науковому співробітнику відділу фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, к.б.н. Зеленій Л.Б. за участь у проведенні молекулярно-генетичних досліджень.

UDK57. 082. 25

I.L. Garmasheva

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine
Zabolotny str, 154, Kyiv-143, Ukraine 03143,
tel.: +38 (044) 526 23 29, e-mail: inna.garmasheva@gmail.com

OCCURRENCE OF ENTEROCIN GENES AMONG ENTEROCOCCI STRAINS ISOLATED FROM HUMAN GASTROINTESTINAL TRACT

Summary

Aim. *To investigate the presence of genes of the most common enterocins A, B and P and to compare antagonistic activity spectra and presence of enterocin genes among enterococci strains, isolated from gastrointestinal tract of elderly people.* ***Methods****. Polymerase chain reaction with primers specific to genes of enterocin A, B and P and statistical data processing using cluster analysis.* ***Results****. Genes of enterocin A, B and P were found in 21 from 58 (64%) enterococci strains, and in 13 strains were found two enterocin genes, and in 3 strains – genes of enterocin A, B and P. The strains with narrow antagonistic spectrum harbored gene combinations A/B/P, A/B, or one of the enterocin genes. The strains with wide antagonistic specrtum also harbored from 1*

to 3 enterocin genes. No relation of antagonistic spectra from Enterococcus species was found. The presence of gene enterocin A, gene combinations A/B and A/B/P was found only in E. faecium strains. ***Conclusions****. Gene of enterocin P and gene combination A/P were the most frequent among enterococci strains used. The spectrum of antagonistic activity does not depend on Enterococcus species and presence of enterocin genes A, B and P.*

Key words: enterococci, antagonistic activity, enterocin genes.

УДК 57. 082. 25

И.Л. Гармашева

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. академика Заболотного, 154, Киев-143, Украина 03143,
тел.: +38 (044) 526 23 29, e-mail: inna.garmasheva@gmail.com

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕНОВ ЭНТЕРОЦИНОВ СРЕДИ ШТАММОВ ЭНТЕРОКОККОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЧЕЛОВЕКА

Реферат

Цель. *Определить наличие генов наиболее распространенных энтероцинов А, В и Р и сравнить спектры антагонистической активности и наличия генов энтероцинов у штаммов энетрококков, выделенных из желудочно-кишечного тракта людей пожилого возраста.* ***Методы****. Полимеразная цепная реакция с праймерами, специфическими к генам энтероцинов А, В и Р, и статистическая обработка данных с использованием кластерного анализа.* ***Результаты****. Гены энтероцинов А, В и Р обнаружены у 21 из 58 (64%) штаммов энтерококков, причем у 13 штаммов обнаружено по два разных гена, а у трех штаммов – гены энтероцинов А, В и Р. Штаммы с узким спектром антагонистического действия содержали комбинации генов А/В/Р, А/В, или один из генов энтероцинов. Штаммы с широким спектром активности также содержали от 1 до 3 генов энтероцинов. Не выявлено зависимости спектра антагонистической активности от видовой принадлежности штаммов энтерококков. Наличие гена энтероцина А, комбинация генов А/В и А/В/Р была обнаружена исключительно у штаммов вида E. faecium.* ***Выводы****. Наиболее распространенным среди изученных штаммов является ген энтероцина Р и комбинация генов А/Р. Спектр антагонистической активности изученных штаммов не зависит от видовой принадлежности и наличия генов энтероцинов А, В и Р.*

Ключевые слова: энтерококки, антагонистическая активность, гены энтероцинов.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Гармашева І.Л., Коваленко Н.К.* Антагоністичні властивості ентерококів, виділених із шлунково-кишкового тракту довгожителів // Мікробіол. журн. – 2008. – т. 70, № 4. – С. 31–39.

2. *Гармашева І.Л., Коваленко Н.К., Зелена Л.Б.* Ідентифікація ентерококів // Мікробіол. журн. – 2009. – т. 71, № 2. – С. 3–12.

3. *Гармашева И.Л., Коваленко Н.К.* Энтероцины – разнообразие, свойства и практическое применение // Мікробіол. журн. – 2011. – т. 73, № 5. – С. 69–76.

4. *Aymerich T., Holo H., Havarstein L.S., Hugas M., Garriga M., Nes I.F.* Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *E. faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – V. 62, № 5. – P. 1676–1682.

5. *Casaus P., Nilsen T., Cintas L.M., Nes I.F., Hernández P.E., Holo H.* Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A // Microbiology. – 1997. – V. 143, № 7. – P. 2287–2294.

6. *Cintas L.M., Casaus P., Håvarstein L.S., Hernández P.E., Nes I.F.* Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-depend bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63, № 11. – P. 4321–4330.

7. *Cintas L.M., Casaus M.P., Herranz C., Nes I.F.*, *Hernández P.E.* Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria // Food Sci. Tech. Int. – 2001. – V. 7, № 4. – P. 281–305.

8. *Cocolin L., Foschino R., Comi G., Fortina M.G.* Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk // Food Microbiol. – 2007. – V. 24, № 7–8. – P. 752–758.

9. *Franz C. M. A. P., van Belkum M. J., Holzapfel W. H., Abriouel H. and Gálvez A.* Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme // FEMS Microbiol. Rev. – 2007. – V. 31, № 3. – P. 293–310.

10. *Kang J.H., Lee M.S.*Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant // J. Appl. Microbiol. – 2005. – V. 98, № 5 – P. 1169–1176.

11. *Klaenhammer T.R.* Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria // FEMS Microbiol. Rev. – 1993. – V. 12. № 1-3. – P. 39–86.

12. *Moreno M.R.F., Callewaert R., Devreese B., Van Beeumen J. and De Vuyst L.*Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources // J. Appl. Microbiol. – 2003. – V. 94, № 2. – P. 214–229.

13. *Ogaki M.B., Rocha K.R., Terra M.R., Furlaneto M.C., Maia L.F.* Screening of the enterocin-encoding genes and antimicrobial activity in *Enterococcus* species// J. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – doi: 10.4014/jmb.1509.09020.

14. *Ozdemir G.B., Oryaşin E., Biyik H.H., Ozteber M., Bozdoğan B.* Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources//Indian J Microbiol. – 2011. – V. 51, № 2. – P. 182–187.

15. *Yost C.K., Nattress F.M.* The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage// Lett. Appl. Microbiol. – 2000. – V. 31, №5. – P. 129–133.

REFERENCES

1. Harmasheva IL, Kovalenko NK. Antagonistic properties of enterococci isolated from gastrointestinal tract of long-livers. Microbiol Z. 2008;70(4):31-39.

2. Harmasheva IL, Kovalenko NK, Zelena LB. Identification of enterococcus strains. Microbiol Z. 2009;71(2):3-12.

3. Garmasheva IL, Kovalenko NK. Enterocins – diversity, properties and practical use. Microbiol Z. 2011;73(5):69-76.

4. Aymerich T, Holo H, Havarstein LS, Hugas M, Garriga M, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *E. faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. Appl Environ Microbiol. 1996;62(5):1676-1682.

5. Casaus P, Nilsen T, Cintas LM, Nes IF, Hernández PE, Holo H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiology. 1997;143(7):2287-2294.

6. Cintas LM, Casaus P, Håvarstein LS, Hernández PE, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-depend bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl Environ Microbiol.1997;63(11):4321-4330.

7. Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernández PE. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Sci. Tech. Int. 2000;**7(**4): 281-305.

8. Cocolin L, Foschino R, Comi G, Fortina MG. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. Food Microbiol. 2007;24(7-8):752-758.

9. Franz CMAP, van Belkum M J, Holzapfel WH, Abriouel H and Gálvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiol Rev. 2007;31(3):293-310.

10. Kang JH, Lee MS. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. J Appl Microbiol. 2005;98(5):1169-1176.

11. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev. 1993;12(1-3):39-86.

12. Moreno MRF, Callewaert R, Devreese B, Van Beeumen J and De Vuyst L. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. J Appl Microbiol. 2003;94(2):214-229.

13. Ogaki MB, Rocha KR, Terra MR, Furlaneto MC, Maia LF. Screening of the enterocin-encoding genes and antimicrobial activity in *Enterococcus* species. J Microbiol Biotechnol. 2016;doi: 10.4014/jmb.1509.09020.

14. Ozdemir GB, Oryaşin E, Biyik HH, Ozteber M, Bozdoğan B. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. Indian J Microbiol. 2011;51(2):182-187.

15. Yost CK, Nattress F.M. The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage. Lett Appl Microbiol. 2000;31(5):129-133.

Стаття надійшла до редакції 12.05.2016 р.

DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.2(34).70742

УДК 582.282.23.045

М.Ю. Русакова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 15 73,
e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

УТВОРЕННЯ ПОЛІВИДОВОЇ БІОПЛІВКИ МОЛОЧНОКИСЛИМИ БАКТЕРІЯМИ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* P17630 ТА ДРІЖДЖОПОДІБНИМИ ГРИБАМИ *CANDIDA ALBICANS* ATCC 18804

Мета. *Вивчення взаємодії клітин Lactobacillus plantarum P17630 та Candida albicans ATCC 18804 при утворенні полівидової біоплівки та встановлення основних етапів її формування.* ***Методи.*** *Взаємодію клітин Lactobacillus plantarum P17630 та Candida albicans ATCC 18804 при утворенні моно- та полівидової біоплівок вивчали за культивування у живильних середовищах MRS і Сабуро. Структуру біоплівок та наявність окремих структурних складових, які визначають ступінь зрілості мікробних асоціацій, визначали за забарвленням кристалічним фіолетовим. Реєстрацію взаємовідносин впродовж формування полівидової біоплівки здійснювали шляхом порівняння показників її оптичної щільності з показниками монобіоплівок L. plantarum P17630 та C. albicans ATCC 18804.* ***Результати.*** *Найбільш інтенсивне утворення монобіоплівки окремими штамами L. plantarum P17630 та C. albicans ATCC 18804 відбувалося впродовж перших двох діб культивування у рідкому живильному середовищі Сабуро. Під час утворення полівидової біоплівки між L. plantarum P17630 та C. albicans ATCC 18804 розвивалася антагоністична взаємодія, найбільший прояв якої спостерігався впродовж перших 48 год культивування, визначаючи порушення структурних компонентів біоплівки.* ***Висновки.*** *В процесі формування моновидових біоплівок було визначено три основних етапи: адгезія клітин до щільної поверхні (перші 24 год), утворення окремих мікроколоній (впродовж другої доби) та формування зрілого суцільного клітинного шару (за 96 год інкубації). Антагоністична взаємодія L. plantarum P17630 та C. albicans ATCC 18804 у складі полівидової біоплівки, зокрема уповільнення розвитку дріжджоподібних грибів та утворення ними суцільного міцелію, була більш вираженою при утворенні еукаріотним учасником угруповання гіфів, ніж окремих дріжджоподібних клітин.*

Ключові слова: полівидова біоплівка, Lactobacillus plantarum, Candida albicans, антагонізм.

У протилежність суспензії (планктону), біоплівка, тобто прикріплена форма існування мікроорганізмів, є поширеною у природних умовах [4]. Мікроорганізми *in vivo*, існуючи на межі розділу фаз, вступають у контакт з біотичною або абіотичною поверхнею, формують специфічні угруповання, а останнім часом підвищується інтерес до вивчення можливих варіантів взаємодії учасників формування біоплівки, молекул, що опосередковують її та форми впливу на відповідні процеси.

Доведено, що у переважної кількості досліджень з полівидовими біоплівками саме антагонізм є основою мікробної взаємодії, яка, очевидно є набагато складнішою, ніж досі вважалося [9]. Крім мікробних, існують також й інші чинники, у тому числі хімічної природи, з якими мікроби стикаються у довкіллі. Наприклад, склад живильного середовища, концентрація кисню, заліза та інших необхідних компонентів, які можуть мати значний вплив на розподіл біомаси та розвиток мікробних асоціацій [14]. Ці фактори можуть модулювати, а іноді значно змінювати взаємодію між різними видами мікроорганізмів біоплівки.

Молочнокислі бактерії є досить різноманітною групою мікроорганізмів, представників яких можна зустріти не тільки у складі мікробіоти людини та тварин, а й у інших екологічних нішах [2]. *Lactobacillus plantarum* P 17630, виділений з піхви здорової жінки штам молочнокислих бактерій, є одним з небагатьох штамів лактобацил з підвищеною здатністю до адгезії, стійких до антибіотиків, що широко застосовуються у терапії кандидозів статевої системи жінок [5]. Колонізуючи відповідні біотопи та утворюючи на щільній поверхні біоплівку, клітини *L. plantarum* P 17630 вступають у взаємодію з іншими мікроорганізмами, зокрема Candida albicans, виявляючи антагоністичні властивості. Але дотепер ще невідомо особливості взаємодії учасників полівидового мікробного угруповання [3].

Метою даної роботи було вивчення взаємодії клітин *Lactobacillus plantarum* P 17630 та *Candida albicans* ATCC 18804 при утворенні полівидової біоплівки та встановлення основних етапів її формування.

Матеріали та методи дослідження

В роботі було використано штами *Lactobacillus plantarum* P17630, виділений з препарату «Гінолакт» (Каталент Італі С.п.А., Італія), та *Candida albicans* ATCC 18804, отриманий з музею культур мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова.

Для культивування використовували живильні середовища: MRS (стандартне живильне середовище для культивування лактобацил), рідкий варіант Сабуро (застосовується для культивування дріжподібних грибів та кислотолюбивих бактерій) та модифікований варіант останнього (зі зменшеною концентрацією глюкози (12,5 г/л) та додаванням L-проліну (0,5 г/л)) [1, 12].

В усіх експериментах попередню підготовку добових культур мікроорганізмів здійснювали згідно з методиками [3, 11]. Робочі суспензії клітин *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804 містили по 5×10^6 КУО/мл. Для отримання змішаної біоплівки з відповідних суспензій готували суміш,

яка містила молочнокислі та дріжджоподібні клітини у співвідношеннях 1:1, 1:10 та 10:1 [13]. При визначенні взаємовідносин під час розвитку полівидової біоплівки *in vitro* проводили також попереднє монокультивування *C. albicans* ATCC 18804 впродовж 48 год, після чого вносили суспензію клітин *L. plantarum* P17630 та продовжували інкубацію ще 48 год.

Культивування мікроорганізмів відбувалося впродовж чотирьох діб при температурі 37 °С у лунках полістиролового планшету. Кожні 24 год визначали ступінь зрілості біоплівки, визначаючи кількість клітин у її складі, а також наявність окремих морфологічних складових. Для цього клітини, що входять до складу біоплівки, забарвлювали кристалічним фіолетовим [9].

Мікроскопію отриманих біоплівок здійснювали за допомогою світлового мікроскопа зі збільшенням 14х20. Фотографування проводили з використанням камери у 8Мп (Apple) та Webcam led HD Trust Fuli1 1080p.

Для кількісного аналізу утворення біоплівки, барвник, який поглинули клітини, вилучали та визначали оптичну щільність отриманого розчину. Облік результатів проводили за допомогою спектрофотометру BioTek “µQuant” (при 592 нм), з подальшим порівнянням показників оптичної щільності елюата зі змішаних біоплівок з сумою показників оптичної щільності від біоплівок монокультур [6].

Для отримання достовірних результатів всі досліди проводили у 6 повторах. При порівняльному аналізі результатів досліджень використовувався t-критерій Стьюдента. Достовірною вважалася різниця за показника $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

На першому етапі визначали інтенсивність утворення моновидової біоплівки досліджуваними мікроорганізмами (табл. 1).

Таблиця 1

Динаміка утворення моновидової біоплівки досліджуваними мікроорганізмами

Table 1

Dynamics of monospecies biofilm formation by the studied microorganisms

Вид мікроорганізму	Час, год	Поживне середовище		
		MRS	Сабуро	Сабуро модифіковане
*Lactobacillus plantarum P17630**	24	0,235±0,009*	0,135±0,007	0,140±0,008
	48	0,366±0,011	0,429±0,020	0,400±0,021
	96	0,408±0,015	0,508±0,019	0,350±0,013
Candida albicans ATCC **18804***	24	0,050±0,003	0,254±0,014	0,174±0,005
	48	0,078±0,006	0,477±0,029	0,396±0,021
	96	0,120±0,010	0,534±0,017	0,650±0,024

Примітка: * – показники оптичної щільності розчину барвника, який поглинули клітини досліджуваного мікроорганізму впродовж утворювання моновидової біоплівки.
Note: * – optical density of dye solution absorbed the studied microorganism cells during monospecies biofilm formation.

Найбільш інтенсивне формування біоплівки *L. plantarum* P17630 впродовж перших 24 год відбувалося у середовищі MRS: оптична щільність практично у 1,5 рази була вищою за аналогічні показники для варіантів середовища Сабуро. На наступному етапі щільність шару біоплівки молочнокислих бактерій збільшилася, проте найбільша кількість клітин була зафіксована у середовищі Сабуро. При подовженні терміну культивування бактерій до четвертої доби також відзначався ріст біоплівки, але менш виражений, в середньому на 15% порівняно з попереднім етапом.

У дріжджоподібних грибів утворення максимального шару біоплівки відбувалося у середовищі Сабуро, про що свідчить рівень оптичної щільності барвника, який у цьому випадку у 1,5–5 разів перевищував відповідні значення у інших середовищах. Впродовж наступних етапів досліду кількість клітин *C. albicans* ATCC 18804 у складі біоплівки збільшувалася, залишаючись найвищою у рідкому середовищі Сабуро. Як і для молочнокислих бактерій, з переходом на четверту добу культивування швидкість формування шару мікроорганізмів на межі розділу фаз дещо уповільнювалася. Проте, найбільша щільність спостерігалася у модифікованому варіанті середовища Сабуро.

Очевидно, відмінності інтенсивності швидкості біоплівки досліджуваними мікроорганізмами зумовлені, як різними розмірами клітин *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804, що визначило різну швидкість осідання на щільну поверхню лунок планшету, так і розбіжностями у складі використаних поживних середовищ, а саме наявністю двохвалентних катіонів металів, зокрема магнію та мангану, які сприяють електростатичній взаємодії клітин зі щільною поверхнею [10].

Окремі стадії формування біоплівок досліджуваними мікроорганізмами, тобто утворення ними моновидових угруповань на межі щільна поверхня–рідина, представлено рис. 1. Дані наведено для тих живильних середовищ, в яких було зафіксовано найбільш інтенсивне утворення біоплівки *L. plantarum* P17630 (середовище MRS) та *C. albicans* ATCC 18804 (обидва варіанти середовища Сабуро).

Отже, на 24 год інкубації на щільній поверхні було визначено окремі клітини досліджуваних мікроорганізмів. Це, очевидно, було зумовлено тим, що одразу після їх внесення у нове живильне середовище, відбувалася адаптація до нього, а також прикріплення (адгезія) мікроорганізмів до межі розділу фаз [8]. Більш висока швидкість пристосування до складу використаного середовища була характерною для дріжджоподібних грибів, що зумовило наявність у складі відповідної біоплівки багатьох клітин, що здійснювали брунькування. У випадку лактобацил було знайдено короткі ланцюжки, які складалися з 2–3 клітин, тобто ці мікроорганізми після адгезії до щільної поверхні також почали розмножуватися.

З часом у складі мікробних біоплівок відбуваються структурні зміни, зокрема підвищення вмісту клітин, що входять до неї, ущільнення мікробних асоціацій – утворення мікроколоній [10].

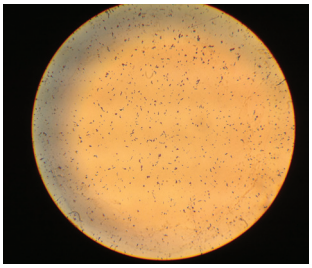
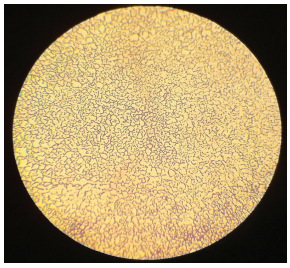
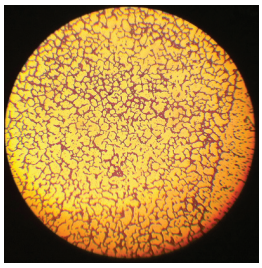
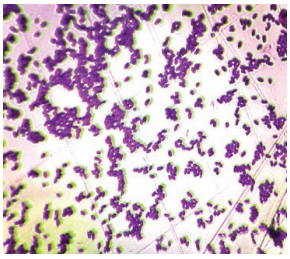
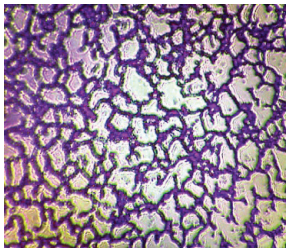
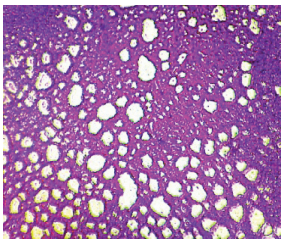
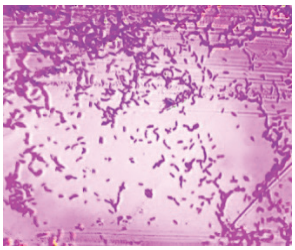
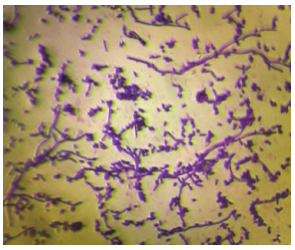
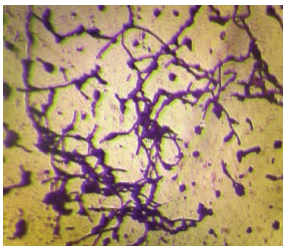
Lactobacillus plantarum P17630 (середовище MRS)*		
		
24 год	48 год	96 год
Candida albicans ATCC **18804 (***середовище* Сабуро)		
		
24 год	48 год	96 год
Candida albicans ATCC **18804 (***середовище* Сабуро модифіковане)		
		
24 год	48 год	96 год

Рис. 1. Структурна організація моновидової біоплівки досліджуваних мікроорганізмів:

фото – забарвлення кристалічним фіолетовим, збільшення x280 (Webcam led HD Trust Fuli1 1080p); * – збільшення x400 (8Мп (Apple))

Fig. 1. Monospecies biofilm structure organization of the studied microorganisms:

photo – crystal violet dye staining, increase x280 (Webcam led HD Trust Fuli1 1080p); * – increase x400 (8Mp (Apple))

Подібні морфологічні перетворення клітинного шару було отримано як для *L. plantarum* P17630, так й *C. albicans* ATCC 18804, на другу добу культивування. Так, у досліджених полях зору біоплівки *L. plantarum* P17630 були присутніми такі угруповання: сформовані мікроколонії лактобацил (приблизно 1/3 від загальної кількості мікроорганізмів), 5–11-клітинні ланцюжки (практично половина) та окремі клітини (лише незначна кількість молочнокислих бактерій).

Однак, для дріжджоподібних грибів, у тому числі представників роду *Candida*, в природних умовах морфогенез біоплівки характеризується зміною форм клітин: дріжджоподібні, гіфальні, псевдогіфальні та ін. [7]. Культивування *in vitro C. albicans* ATCC 18804 у живильних середовищах із зниженним вмістом вуглеводів, зокрема глюкози, та наявністю деяких амінокислот, призводить до утворення саме гіфоподібних структур та псевдогіфів, які є обов'язковими елементами біоплівок, що спостерігаються при розвитку поверхневих кандидозів *in vivo* [15].

Відповідні зміни було зафіксовано впродовж 48-ми год культивування досліджуваного штаму *C. albicans* ATCC 18804 у модифікованому живильному середовищі Сабуро. У даному варіанті рідкого живильного середовища спостерігалося зміщення форми клітин у бік поляризованого росту, тобто клітини мали ростові трубки та видовжену форму, відбувалося формування гіфів.

Збільшення терміну росту мікроорганізмів на щільній поверхні до 96 год дозволило зафіксувати процес дозрівання моновидових біоплівок. У середовищах MRS та Сабуро клітинний шар ставав більш щільним, окремі угруповання зливалися, утворюючи суцільну біоплівку.

У складі біоплівки, яку утворювали клітини *C. albicans* ATCC 18804 у модифікованому варіанті середовища Сабуро, кількість подовжених клітин – гіфів – зростала з часом та на четверту добу досягла максимального рівня при візуальному контролі морфогенезу.

Реєстрація взаємовідносин впродовж формування біоплівки двома видами мікроорганізмів відбувалася за порівняння показників оптичної щільності змішаної біоплівки ($ОЩ_{mix}$) з показниками окремих досліджуваних видів – *L. plantarum* P17630 ($ОЩ_{L)}$ та *C. albicans* ATCC 18804 ($ОЩ_{C}$) [6, 11] (табл. 2).

Якщо спостерігається адитивний ефект, тобто показники змішаних біоплівок достовірно не відрізняються від суми показників кожного штаму ($ОЩ_{L}$+$ОЩ_{C}$) – реєструється нейтральний характер міжмікробної взаємодії. При $ОЩ_{mix}$ > ($ОЩ_{L}$+$ОЩ_{C}$) спостерігається синергізм мікроорганізмів. Проте, якщо значення $ОЩ_{mix}$ < ($ОЩ_{L}$+$ОЩ_{C}$), йдеться про антагоністичні взаємовідносини клітин культур, які утворили біоплівку [6].

Сумісне культивування *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804 призвело до суттєвих змін інтенсивності формування біоплівки мікроорганізмами. Найбільш виражені розбіжності у порівнянні з моновидовими біоплівками було виявлено на другу добу культивування. У цьому випадку значення оптичної щільності отриманих розчинів кристалічного фіолетового було практично у 4 та 2,5 рази меншими за суму показників окремих культур у середовищах Сабуро та Сабуро модифіковане (I варіант експерименту), відповідно.

Подовження культивування викликало незначне зменшення антагоністичної активності, але відповідні показники для полівидових біоплівок, в середньому, досягли лише 70% від суми окремих культур *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804.

Таблиця 2

Динаміка утворення полівидової біоплівки досліджуваними мікроорганізмами

Table 1

Dynamics of polyspecies biofilm formation by the studied microorganisms

Середовище	Час, год	Співвідношення клітин *L. plantarum* та *C. albicans*		
		1L : 1C	1L : 10C	10L : 1C
Сабуро*	24	0,400±0,019	0,405±0,013	0,376±0,011
	48	0,216±0,007**	0,317±0,010**	0,201±0,008**
	96	0,651±0,026**	0,715±0,029**	0,638±0,032**
Сабуро модифіковане: I варіант*	24	0,223±0,011**	0,201±0,009**	0,198±0,012**
	48	0,324±0,017**	0,302±0,013**	0,245±0,010**
	96	0,750±0,035**	0,693±0,024**	0,704±0,031**
Сабуро модифіковане: II варіант*	24	–	–	–
	48	0,291±0,012**	0,287±0,010**	0,205±0,016**
	96	0,662±0,029**	0,687±0,035**	0,748±0,038**

Примітка: * – показники оптичної щільності розчину барвника, який поглинули клітини досліджуваного мікроорганізму впродовж утворювання полівидової біоплівки; L – *L. plantarum* P17630; C – *C. albicans* ATCC 18804; I варіант – одночасне внесення у поживне середовище культур *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804; II варіант – послідовне внесення у поживне середовище культур (спочатку *C. albicans* ATCC 18804, за 48 годин – *L. plantarum* P17630); ** – різниця вірогідна у порівнянні з сумою оптичних щільностей при утворенні моновидових біоплівок *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804.

Note: * – optical density of dye solution absorbed the studied microorganism cells within polyspecies biofilm formation; L – *L. plantarum* P17630; C – *C. albicans* ATCC 18804; 1st variant – the simultaneous introduction *L. plantarum* P17630 and *C. albicans* ATCC 18804 in nutrient medium; 2nd variant – the consistent introduction in nutrient medium (firstly *C. albicans* ATCC 18804, in 48 hrs – *L. plantarum* P17630) ** – probable difference compared with the optical density sum during the monospecies biofilm formation of *L. plantarum* P17630 and *C. albicans* ATCC 18804.

Порівнюючи різні співвідношення клітин *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804 було встановлено, що вихідна кількість мікроорганізмів, які ініціюють формування полівидової біоплівки, не завжди є тим чинником, що визначає ступінь прояву антагоністичної взаємодії. Значення оптичної щільності кристалічного фіолетового, який було поглинуто клітинами, що сформували шар полівидової біоплівки, практично збігалися за різних співвідношень *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804, особливо на початкових етапах цього процесу. Незначні розбіжності, скоріше за все, є наслідком різниці у розмірах молочнокислих та дріжджоподібних мікроорганізмів. Отже, адгезія клітин

до щільної поверхні, яка відбувається на першому етапі утворення біоплівки, є для даних мікроорганізмів незалежним процесом для кожної культури [4].

Наступний період сумісного культивування викликав значні зміни у інтенсивності утворення полівидової біоплівки. У всіх варіантах спостерігалося зменшення кількості клітин у складі біоплівки у порівнянні з сумою окремих культур. Найбільше зменшення, більше ніж у тричі порівняно з моновидовими культурами, було зафіксовано для співвідношення 1:1 та 10:1 клітин *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804, відповідно. Очевидно, клітини молочнокислих бактерій, які на попередньому етапі інкубації вже прикріпилися до поверхні лунок планшету, почали розмножуватися та утворювати сполуки, які зумовили антагоністичну дію лактобацил щодо культури *C. albicans* ATCC 18804.

За 96 год сумісного культивування виявлено зменшення кількості досліджуваних мікроорганізмів, приблизно 30–40% порівняно з сумарним показником. Найменш вираженим даний ефект був у випадку співвідношення мікроорганізмів 1:10 (*L. plantarum* : *C. albicans*), що, можливо, викликано підвищенням швидкості процесу розмноження дріжджоподібних грибів саме на другу–третю добу перебування у живильному середовищі, та через це зменшенням чутливості до антагоністичного впливу лактобацил [12].

Проте, було визначено, що послідовність внесення мікроорганізмів у живильне середовище досить суттєво впливає на розвиток культур. У другому варіанті експерименту (середовище Сабуро модифіковане) відбувалося окреме культивування *C. albicans* ATCC 18804 впродовж 48 годин, після чого додавалася суспензія молочнокислих бактерій. Така послідовність внесення культур дозволила визначити вплив *L. plantarum* P17630 на вже досить зрілий шар біоплівки дріжджоподібних грибів [11]. У порівнянні з дослідом, в якому проводилося сумісне культивування мікроорганізмів, кількість клітин, що входили до складу біоплівки на другу добу, знизилася, в середньому, на 15–25%.

Взагалі, утворені *C. albicans* ATCC 18804 гіфи та гіфоподібні структури були більш чутливими до дії молочнокислих бактерій. Різниця між значеннями оптичної щільності у I та II варіантах модифікованого середовища Сабуро складала від 5 до 37 %. Однак, такі відмінності частіше спостерігалися на пізніх строках формування досліджуваної полівидової біоплівки.

Отримані дані, очевидно, зумовлені тим, що за прояву антагоністичних взаємовідносин між лактобацилами та дріжджоподібними грибами одним з ключових моментів є прикріплення клітин одного виду до іншого, яке може відбуватися тільки за наявності гіфів останніх [15]. Поява гіфів у *C. albicans* є тим чинником, що змінює його відносну толерантність на досить агресивний вплив щодо організму людини [12].

Спостереження за морфологічними змінами під час утворення полівидової біоплівки *L. plantarum* P17630 : *C. albicans* ATCC 18804 показало, що початковий етап її утворення (24 год інкубації) не відрізнявся від такого для монокультур (рис. 2).

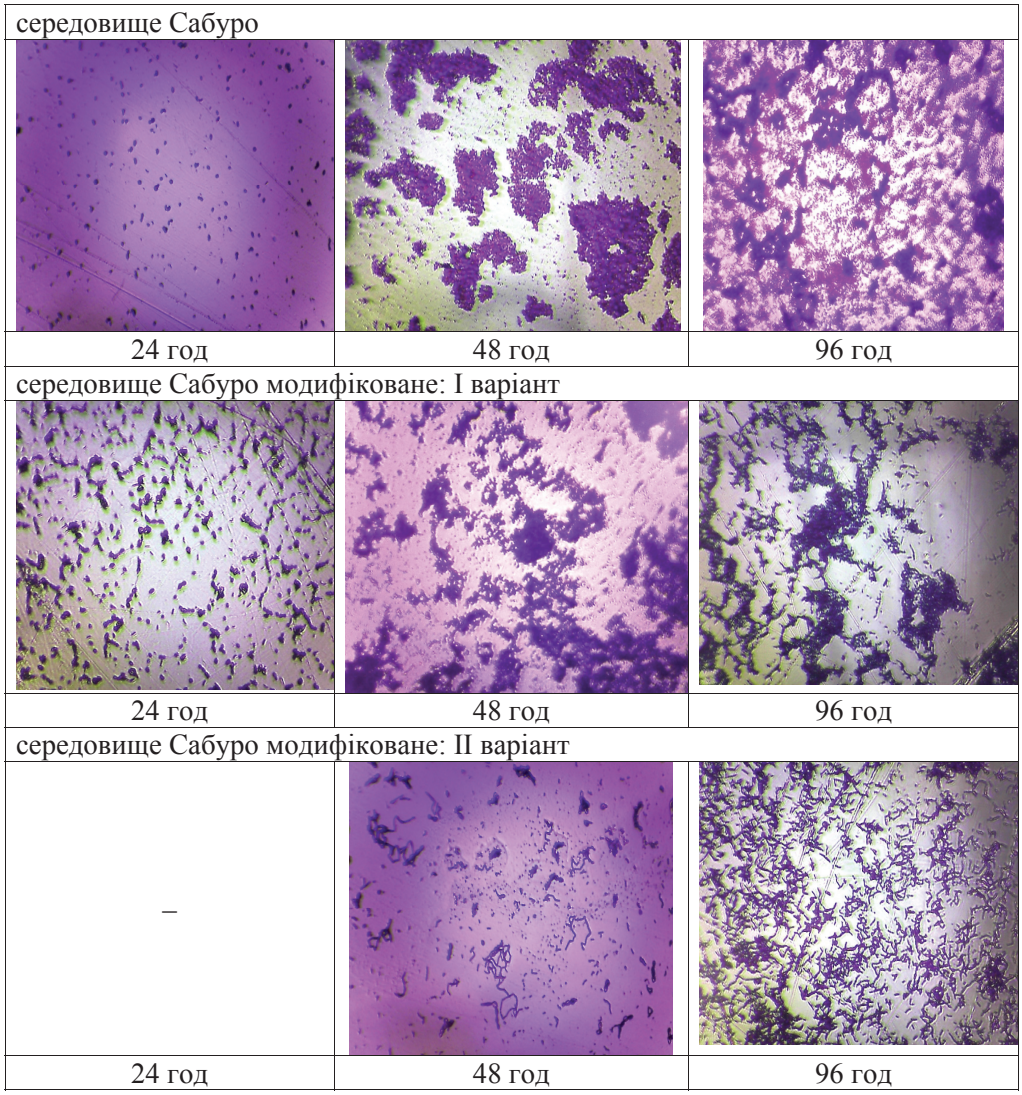


Рис. 2. Структурна організація полівидової біоплівки *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804:

фото – забарвлення кристалічним фіолетовим, збільшення x280 (Webcam led HD Trust Fuli1 1080p)

Fig. 2. Polyspecies biofilm structure organization of *L. plantarum* P17630 and *C. albicans* ATCC 18804:

photo – crystal violet dye staining, increase x280 (Webcam led HD Trust Fuli1 1080p)

На відміну від попередньої стадії на 48-у год культивування були зафіксовані досить значні зміни розвитку мікробної біоплівки. У складі біоплівки не виявлено сформованих мікроколоній ні лактобацил, ні дріжджоподібних грибів. При цьому спостерігалося суттєве зменшення вмісту ростових трубок та псевдогіфів, утворених *C. albicans* ATCC 18804 при культивуванні у модифікованому

середовищі Сабуро. Формування останніх необхідно *C. albicans* для ухилення від фагоцитів, виходу з кровоносних судин і колонізації поверхонь медичних матеріалів з утворюванням біоплівки [8]. Крім того, як окремі дріжджові клітини, так і гіфи *C. albicans*, знаходять в інфікованих нею органах [7]. Вірогідно, такому морфогенезу впродовж життєвого циклу сприяють специфічні властивості самої *C. albicans.* Очевидно, наявність лактобацил у складі змішаної біоплівки викликала порушення розвитку еукаріотного учасника консорціуму.

Структурна організація полівидової біоплівки на 96 год інкубації також суттєво відрізнялася від розвитку моновидових біоплівок. Практично не відбувалося злиття та формування суцільного щільного шару біоплівки. Клітини молочнокислих бактерій заповнили проміжки між мікроколоніями та окремими псевдогіфами *C. albicans* ATCC 18804.

Отримані характеристики узгоджуються з даними літератури щодо культури *Lactobacillus* GG, що заблоковувала формування ростових трубок *C. albicans* під час сумісного культивування у середовищі, яке містило сироватку, тобто модуляцію морфогенезу дріжджоподібного гриба [3].

Таким чином, порушення процесів переходу стадій дріжджі-гіфи *Candida albicans* за допомогою молочнокислих бактерій може стати засобом для лікування кандидозів слизових оболонок та шкіряних покривів та суттєво поглибити розуміння механізмів взаємодії мікроорганізмів під час утворення полівидових біоплівок.

M.Yu. Rusakova

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (0482) 63 15 73, e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

MULTISPECIES BIOFILM FORMATION BY LACTIC ACID BACTERIA *LACTOBACILLUS PLANTARUM* P17630 AND YEASTS *CANDIDA ALBICANS* ATCC 18804

Summary

Aim. *The study Lactobacillus plantarum P17630 and Candida albisans ATCC 18804 cell interaction in multispecies biofilm and its main formation stage identification.* ***Methods.*** *Interaction of Lactobacillus plantarum P17630 and Candida albicans ATCC 18804 cells during the formation of mono- and multispecies biofilm was studied using culture media: MRS and Sabouraud. The biofilm structure and certain structural component presence determined the maturity level of microbial associations were detected by crystal violet staining. The interactions were registered during the polyspecies biofilm formation by comparing its optical density with L. plantarum P17630 and C. albicans ATCC 18804 monospecies ones.* ***Results.*** *The most intensive formation of monospecies biofilms by individual L. plantarum P17630 and C. albicans ATCC 18804 strains occurred within the first two days cultivation in liquid medium Sabouraud. The most manifestation of the developed antagonistic interaction between L. plantarum and C. albicans was observed for the first 48 hrs of cultivation, defining breach of the structural biofilm components.* ***Conclusions.*** *The adhesion of cells to solid surface (first 24 hrs), the individual microcolony for-*

mation (for the second day) and mature cell layer forming (96 hrs incubation) were three main phases during the monospecies biofilm formation. The antagonistic interaction between L. plantarum and C. albicans as a part of multispecies biofilms, in particular slowing down the yeast development and mature cell layer formation, was more influenced on the hyphae community generation than individual yeast cells.

Key words: multispecies biofilm, Lactobacillus plantarum, Candida albicans, antagonism.

М.Ю. Русакова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 63 15 73,
e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

ОБРАЗОВАНИЕ ПОЛИВИДОВОЙ БИОПЛЕНКИ МОЛОЧНОКИСЛЫМИ БАКТЕРИЯМИ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* P17630 И ДРОЖЖЕПОДОБНЫМИ ГРИБАМИ *CANDIDA ALBICANS* ATCC 18804

Реферат

Цель. *Изучение взаимодействия клеток Lactobacillus plantarum P17630 и Candida albicans ATCC 18804 при образовании поливидовой биопленки и определение основных этапов ее формирования.* ***Методы.*** *Взаимодействие клеток Lactobacillus plantarum P17630 и Candida albicans ATCC 18804 при образовании моно- и поливидовой биопленки изучали при культивировании в питательных средах MRS и Сабуро. Структуру биопленок и наличие отдельных структурных составляющих, которые определяют степень зрелости микробных ассоциаций, определяли при окрашивании кристаллическим фиолетовым. Регистрацию взаимоотношений во время формирования поливидовой биопленки осуществляли путем сравнения показателей ее оптической плотности с показателями монобиопленок L. plantarum P17630 и C. albicans ATCC 18804.* ***Результаты.*** *Наиболее интенсивное образование монобиопленки отдельными штаммами L. plantarum P17630 и C. albicans ATCC 18804 происходило в течение первых двух суток культивирования в жидкой питательной среде Сабуро. Во время образования поливидовой биопленки между L. plantarum P17630 и C. albicans ATCC 18804 развивалось антагонистическое взаимодействие, наибольшее проявление которого наблюдалось в течение первых 48 часов культивирования, обуславливая нарушения структурных компонентов биопленки.* ***Выводы.*** *В процессе формирования моновидовых биопленок было определено три основных этапа: адгезия клеток к твердой поверхности (первые 24 ч), образования отдельных микроколоний (в течение вторах суток) и формирование зрелого сплошного слоя клеток (за 96 ч инкубации). Антагонистическое взаимодействие L. plantarum P17630 и C. albicans ATCC 18804 в составе поливидовой биопленки, в частности замедления развития дрожжеподобных грибов и формирования ими сплошного мицелия, было более выраженным при образовании эукариотным участником сообщества гифов, чем отдельных дрожжеподобных клеток.*

Ключевые слова: поливидовая биопленка, Lactobacillus plantarum, Candida albicans, антагонизм.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Квасников Е.И.* Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1995. – 350 с.

2. *Ленцнер А.А., Ленцнер Х.П., Микельсаар М.Э.* Лактофлора и колонизационная резистентность // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 2008. – Т. 32, № 3. – С. 173–179.

3. *Boris S., Barbes C.* Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens // Microbes and Infection. – 2000. – Vol. 2. – P. 543–546.

4. *Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G.* Bacterial biofilms in nature and disease // Annu Rev Microbiol. – 2007. – Vol. 41. – P. 435–464.

5. *Dho G., Marchese A., Debbia E.A.* Microbiological characteristics of *Lactobacillus plantarum* P17630 containined in vaginal suppositories // Giornale Italiano di Microhiobgia Medica Odontoiatrica e Clinica. – 2003. – Vol. 7. – P. 102-108.

6. *Jack M., Wood B.J., Berry D.R.* Evidence for the involvement of thiocyanate in the inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus* // Microbios. – 2000. – Vol. 62. – P. 37–46.

7. *Jacobsen I.D., Wilson D., Wochtler B. Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target // Expert. Rev. Antiinfect. Ther. – 2012. – Vol. 10. – P. 85–93.

8. *Lajean Chaffin W., Pez-Ribot J.L.L., Casanova M.* Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2008. – P. 130–180.

9. *Mayer C.* The role of intermolecular interactions studies on model systems for bacterial biofilms // Int. J. Biol. Macromol. – 2001. – Vol. 26. – P. 3–16.

10. *Pamp S.J., Gjermansen M., Tolker-Nielsen T.* The biofilm mode of life mechanisms and adaptations // Horizon Bioscience. – 2007. – Vol. 16. – P. 37–69.

11. *Purohit B.C., Joshi K.R., Ramdeo I.N., Bharadwaj T.P.* The formation of germ tubes by *Candida albicans*, when grown with *Staphylococcus pyogenes*, *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Lactobacilius acidophilus* and *Proteus vulgaris* // Mycopathologia. – 2011. – Vol. 62. – P. 187–189.

12. *Seneviratne C.J., Jin L.J., Samaranayake L.P.* Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review // Oral Dis. – 2008. – Vol. 14. – P. 582–590.

13. *Strus M., Kucharska A., Kukla G., Brzychczy-Wloch M., Maresz K., Heczko P.B.* The *in vitro* activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida* // Infect Dis. Obstet. Gynecol. – 2005. – Vol. 13. – P. 69–75.

14. *Su J. P., Kyoung-Hee H., Joo Young P.* Influence of bacterial presence on biofilm formation // Yonsei Med. J. – 2014. – Vol. 55. – P. 449–458.

15. *Toenjes. K.A., Stark B.C., Brooks K.M., Johnson D.I.* Inhibitors of cellular signalling are cytotoxic or block the budded-to-hyphal transition in the pathogenic yeast *Candida albicans* // J. Med. Microbiol. – 2009. – Vol. 58. – P. 779–790.

REFERENCES

1. Kvasnikov EI. Lactic acid bacteria and their application. Moscow: Nauka, 1995. 350 p.

2. Lentsner AA, Lentsner CP, Mikelsaar ME. Lactoflora and colonization resistance. Antibiot. Med. Biotech. 2008; 32(3):173-179.

3. Boris S, Barbes C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. Microbes and Infection. 2000; 2:543-546.

4. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol. 2007; 41:435-464.

5. Dho G, Marchese A, Debbia EA. Microbiological characteristics of *Lactobacillus plantarum* P17630 containined in vaginal suppositories. Giornale Italiano di Microhiobgia Medica Odontoiatrica e Clinica. 2003; 7:102-108.

6. Jack M, Wood BJ, Berry DR. Evidence for the involvement of thiocyanate in the inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*. Microbios. 2000; 62:37-46.

7. Jacobsen ID, Wilson D, Wochtler B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. Expert. Rev. Antiinfect. Ther. 2012; 10:85-93.

8. Lajean Chaffin W, Pez-Ribot JLL, Casanova M. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2008; 130-180.

9. Mayer C. The role of intermolecular interactions studies on model systems for bacterial biofilms. Int. J. Biol. Macromol. 2001; 26:3-16.

10. Pamp SJ, Gjermansen M, Tolker-Nielsen T. The biofilm mode of life. mechanisms and adaptations. Horizon Bioscience. 2007; 16:37-69.

11. Purohit BC, Joshi KR, Ramdeo IN, Bharadwaj TP. The formation of germ tubes by *Candida albicans*, when grown with *Staphylococcus pyogenes*, *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Lactobacilius acidophilus* and *Proteus vulgaris*. Mycopathologia. 2011; 62:187-189.

12. Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral Dis. 2008; 14: 582-590.

13. Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzychczy-Wloch M, Maresz K, Heczko PB. The *in vitro* activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. Infect Dis. Obstet. Gynecol. 2005; 13:69-75.

14. Su JP, Kyoung-Hee H, Joo Young P. Influence of bacterial presence on biofilm formation. Yonsei Med. J. 2014; 55:449-458.

15. Toenjes. KA, Stark BC, Brooks KM, Johnson DI. Inhibitors of cellular signalling are cytotoxic or block the budded-to-hyphal transition in the pathogenic yeast *Candida albicans*. J. Med. Microbiol. 2009; 58:779-790.

Стаття надійшла до редакції 04.03.2016 р.

DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.2(34).70744

УДК 633.112:57.085.2

Г.О. Доброва[1], І.С. Замбріборщ[1], О.Л. Шестопал[1], О.М. Ружицька[2]

[1] Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Овідіопольська дорога, 3, 65036, Одеса, Україна, тел.: +38(095) 050 46 05, e-mail dobrovaann@gmail.com

[2] Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, Дворянська, 2, 65082, Одеса, Україна

ЧУТЛИВІСТЬ ДО АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO* ПОЛБИ ЗВИЧАЙНОЇ *TRITICUM DICOCCUM* (SCHRANK) SCHUEBL

Мета. *Оцінити вплив живильного середовища на індукцію новоутворень і регенерацію рослин полби.* ***Методи***. *Дослідження проводили на двох ярих генотипах полби. Рослини вирощували на польових ділянках. Попередню обробку колосся проводили у водному розчині абсцизової кислоти (0,5 мг/л) протягом п'яти діб. Пиляки експлантували на живильні середовища С17 і М42. Для регенерації рослин використовували варіанти живильного середовища MS, що різнилисяь вмістом амінокислот і регуляторів росту.* ***Результати.*** *В роботі вперше в Україні досліджено індукцію новоутворень та регенерацію рослин ярих форм полби Triticum dicoccum (Schrank) Schuebl в культурі пиляків in vitro. Полба характеризується низькою спроможністю до андрогенезу in vitro. Рівень індукції новоутворень був високим, проте в культурі утворилися лише безхлорофільні рослини-регенеранти. Вища індукція новоутворень і подальша регенерація отримані за культивування пиляків на живильному середовищі С17 порівняно з середовищем М42. З отриманих новоутворень отримали лише хлорофілдефектні рослини-регенеранти на всіх регенераційних живильних середовищах. Значної різниці рівня регенерації на варіантах регенераційного середовища MS з різним вмістом регуляторів росту не відмічено.* ***Висновки***. *Полба звичайна характеризується відносно високою індукційною спроможністю. Найкращим індукційним живильним середовищем є середовище С17. Значної різниці рівня регенерації на досліджених варіантах регенераційного живильного середовища MS не виявлено. Дослідження чутливості до андрогенезу in vitro полби звичайної не виявило чутливих до методу генотипів, здатних до регенерації зелених рослин.*

Ключові слова: культура пиляків, Triticum dicoccum, індукція новоутворень, регенерація, живильне середовище.

Полба є однією з перших рослин, окультурених людиною. У сьогоденні цей злак використовують у схрещуваннях для привнесення у сорт низки корисних ознак [3]. Дослідження чутливості полби до андрогенезу *in vitro* є важливою задачею. Чутливі генотипи можуть бути у подальшому залученні до схрещення з пшеницею твердою як потенційні «донори регенерації». На

ефективність процесу формування подвоєних гаплоїдів методом культури пиляків впливають декілька факторів, зокрема генотип [8,10], індукційні та регенераційні живильні середовища [5].

Мета роботи – оцінка впливу живильного середовища на індукцію новотворень і регенерацію рослин полби. Дослідження індукції новоутворень озимих та ярих форм *T. dicoccum* на території України проводиться вперше.

Матеріали і методи

Дослідження проводили у 2013–2015 рр. Як донорний матеріал використовували ярі форми *T. dicoccum* var dicoccum, *T. dicoccum* var rufum. Рослини вирощували на дослідних польових ділянках СГІ–НЦНС. Пиляки експлантували на живильні середовища, коли вакуолізовані мікроспори знаходилися у середньопізній фазі розвитку (рис. 1). Попередню обробку зрізаних пагонів проводили у водному розчині абсцизової кислоти (0,5 мг/л) протягом 5 діб при +2 – +4 °С у темряві [2]. Колосся поверхнево стерилізували насиченим розчином гіпохлориту кальцію за методикою [1]. Пиляки експлантували на живильні середовища С17 [11] і М42 [7], які використовуються для індукції новоутворень в культурі пиляків пшениці твердої [4, 6]. За складом гормонів середовища були ідентичними: 2,4-Д в концентрації 2 мг/л та кінетин в концентрації 0,5 мг/л.

Висаджені пиляки культивували перші 3 доби у темряві за температури +30 °С, далі при + 24 °С до появи новоутворень. Новоутворення експлантували на варіанти живильного середовища MS. Сольовий і вітамінний склад середовища був стандартним [9], варіанти модифікували за вмістом амінокислот і регуляторів росту (табл. 1).

Таблиця 1

Середовища для регенерації рослин

Table 1

Plant regeneration media

Склад	Назва живильного середовища			
	MS 1	MS 2	MS 3	MS 4
Глютамін, мг/л	200,0	200,0	200,0	–
Пролін, мг/л	200,0	200,0	200,0	–
ІОК, мг/л	1,0	1,0	0,5	1,0
Кінетин, мг/л	1,0	–	0,5	–
БАП, мг/л	–	1,0	–	1,0

Результати та обговорення

В ході дослідження проводили пошук оптимального індукційного та регенераційного живильних середовищ. З літературних джерел відомо, що для індукції новоутворень пшениці твердої також використовують живильні середовища С17 і М42. Визначали індукцію новоутворень полби звичайної на цих живильних середовищах (рис. 1).

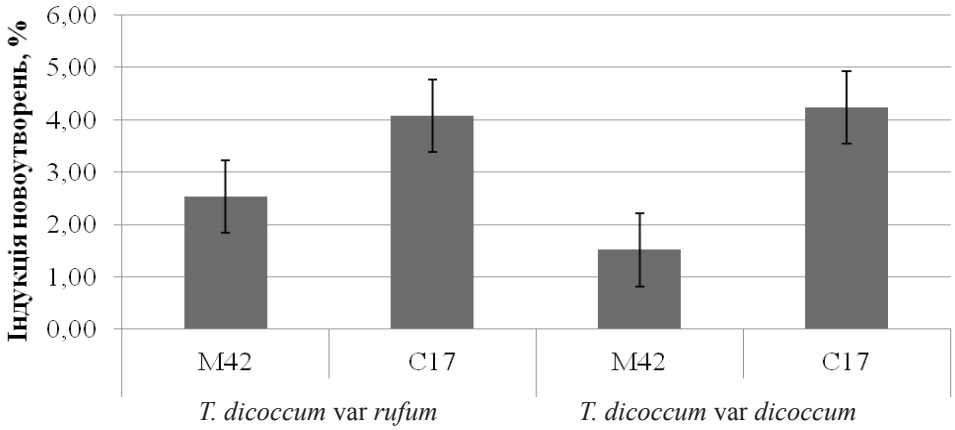


Рис. 1. Індукція новоутворень полби звичайної ярої на різних живильних середовищах

Примітка: % – відсоток новоутворень від кількості висаджених пиляків.

Fig. 1. Induction of spring emmer on different cultural media

Note: % – percent of newformations per number of cultivated anthers

Слід зазначити, що для обох досліджених генотипів найвищу індукцію новоутворень отримали на середовищі С17, однак достовірний вплив індукційного середовища на цей показник встановили тільки для *T. dicoccum* var dicoccum.

Індукційне живильне середовище і умови культивування пиляків впливають також на регенерацію рослин. Нажаль, у дослідженні отримано лише *albino* (хлорофіл дефектні) рослини-регенеранти (табл. 2).

Таблиця 2

Регенерація *albino* рослин ярих форм полби звичайної

Table 2

Regeneration of albino plants of spring emmer

Генотип	Індукційне середовище	%
T. dicoccum var rufum	M42	1,56±0,55
	C17	2,42±0,51
T. dicoccum var dicoccum	M42	0
	C17	1,84±0,58

Максимальну регенерацію рослин для обох досліджених генотипів відмічено при використанні індукційного середовища С17. Таким чином, можна рекомендувати дане середовище як індукційне живильне середовище для культури пиляків *in vitro* полби.

На вихід рослин-регенерантів істотний вплив має регенераційне живильне середовище (рис. 2). До експерименту були залучені варіанти живильних середовищ MS (табл. 1).

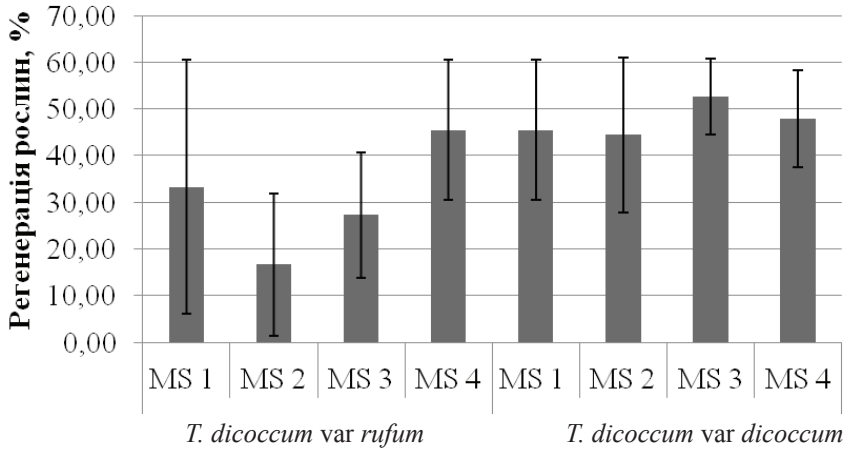


Рис. 2. Регенерація полби на різних середовищах

Примітка: % – відсоток рослин-регенерантів від кількості висаджених новоутворень

Fig. 2. Emmer regeneration on different cultural media

Note: % – percent of regenerated plants per number of cultivated newformations

Достовірної різниці регенерації рослин на різних живильних середовищах не виявили для обох досліджених генотипів. Різниця в рівні регенерації рослин генотипу *T. dicoccum* var dicoccum спостерігалася, але не була підтверджена статистично. Не зважаючи на відносно високу індукцію і регенерацію, в культурі пиляків *in vitro* полба звичайна характеризувалася регенерацією лише хлорофілдефектних рослини.

На основі проведеного дослідження можна зазначити, що полба звичайна характеризується відносно високою індукційною спроможністю, проте низькою регенерацією. Найкращим індукційним живильним середовищем було С17. Значної різниці рівня регенерації на досліджених варіантах регенераційного живильного середовища MS не виявлено. Дослідження чутливості до андрогенезу *in vitro* полби звичайної не виявило чутливих до методу генотипів, здатних до регенерації зелених рослин.

H.O. Dobrova[1], I.S. Zambriborsh[1], O.L. Shestopal[1], O.M. Rujitska[2]

[1] The Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed & Cultivar Investigation Odesa, Ovidiopolska road, 3, 65036, Ukraine

[2] Odesa I.I. Mechnykov National University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine

TRITICUM DICOCCUM (SCHRANK) SCHUEBL SENSITIVITY TO ANDROGENESIS *IN VITRO*

Summary

Aim. *To estimate the influence of cultural media on induction and plant regeneration of emmer.* ***Methods****. The research was performed on two spring emmer genotypes. Plants were cultivated in field conditions. Spike pretreatment was conducted with abscisic acid water solution (0.5 mg/ml) for 5 days. Anthers were cultivated on cultural media C17 and M42. The variants of cultural media MS with different amino acids and growth regulators were used for plant regeneration.* ***Results****. Investigations of this culture ability to androgenesis in vitro have never been conducted before. Emmer demonstrated the low ability to androgenesis in vitro. The induction level was high, but only albino regenerated plants were obtained. In research induction and regeneration level of emmer on different cultural media was determined. It was detected that induction and further plant regeneration is higher while anthers were cultivated on C17 media, comparing with M42 media. Four variants of MS media with different plant growth regulators and amino acids were used for plant regeneration. No difference between variants was observed.* ***Conclusions****. Emmer is characterized with relatively high induction ability. Optimal induction cultural media was C17. No significant difference of regeneration level on different variants of regeneration cultural media was detected. No responsible emmer genotypes with the ability to green planter generation were determined in the investigation.*

Key words: anther culture, Triticum dicoccum, new formatiom induction, regeneration, cultural media.

А.А. Доброва[1], И.С. Замбриборщ[1], О.Л. Шестопал[1], О.Н. Ружицкая [2]

[1] Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноводства и сортоизучения НААН Украины, Украина, 65036, Одесса, Овидиопольская дорога, 3, тел.: +38(095) 050 46 05, e-mail: dobrovaann@gmail.com

[2] Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, Дворянская, 2, 65082, Одесса, Украина

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO* ПОЛБЫ ОБЫКНОВЕННОЙ *TRITICUM DICOCCUM* (SCHRANK) SCHUEBL

Реферат

Цель. *Оценить влияние питательной среды на индукцию новообразований и регенерацию растений полбы.* ***Методы****. Исследование проводили на двух яровых генотипах полбы. Растения выращивали на полевых участках. Предобработку колосьев проводили в водном растворе абсцизовой кислоты (0,5 мг/л) в течение 5 дней. Пыльники культивировали на питательных средах С17 и М42. Для ре-*

генерации растений использовали варианты питательной среды MS, которые отличались содержанием аминокислот и регуляторов роста. ***Результаты****. В работе впервые в Украине провели исследование индукции новообразований и регенерации растений яровых форм полбы Triticum dicoccum (Schrank) Schuebl in vitro. Полба характеризуется низкой способностью к андрогенезу in vitro. Уровень индукции новообразований был высоким, но в культуре получили только безхлорофильные растения-регенеранты. Более высокую индукцию и дальнейшую регенерацию растений наблюдали при условии культивирования пыльников на питательной среде С17, в сравнении со средой М42. Из новообразований получили только хлорофиллдефектные растения-регенеранты на всех протестированных регенерационных питательных средах. Значительной разницы уровня регенерации на вариантах среды MS, отличающихся содержанием регуляторов роста, не отмечено.* ***Выводы.*** *Полба характеризуется относительно высокой способностью к индукции новообразований. Оптимальной индукционной питательной средой является С17. Значительной разницы уровня регенерации на исследованных вариантах регенерационной питательной среды не наблюдалось. Исследование чувствительности к андрогенезу in vitro полбы обыкновенной не определило чувствительных к этому методу генотипов, способных к регенерации зеленых растений.*

Ключевые слова: пыльниковая культура, Triticum dicoccum, индукция новообразований, регенерация, питательная среда.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Ігнатова С.О.* Фактори, що впливають на реалізацію регенераційного потенціалу мікроспор в культурі пиляків м'якої пшениці / С.О. Ігнатова, К.І. Лобанова // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – 2007. – Т. 2. – С. 492–496.

2. *Лобанова К.І., Шестопал О.Л., Ігнатова С.О.* Абсцизова кислота як екзогенний фактор підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків м'якої пшениці // Вісник Харків. Націон. Аграрного Університету. – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 102–110.

3. *Маркелова Т.С.* Использование диких видов и сородичей пшеницы для ингрогрессии генов устойчивости к болезням / Т.С. Маркелова // Агро XXI. – 2007. – Т. 4. – С. 16–18.

4. *Cistué, L.* Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture / L. Cistué, M. Soriano, A.M. Castillo [et al.] // Plant Cell Reports. – 2006. – V. 25, № 4. – P. 257–264.

5. *Datta S.K.* Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement / S.K. Datta // Current Science-Bangalore. – 2005. – V. 89, № 1. – P. 1870–1872.

6. *Dogramaci-Altuntepe M.* Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization / M. Dogramaci-Altuntepe, T.S. Peterson, P.P. Jauhar // J. Hered. – 2001. V. 192, № 1. – P. 56–64.

7. *Kao K.N.* Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods / K.N. Kao, M. Saleem, S. Abrams [et al.] // Plant Cell Rep. – 1991. – V. 9. – P. 595–607.

8. *Khiabani B.N., Vedadi C., Rahmani E.* (2008) "Response of some Iranian wheat genotypes to anther culture system", Indian Journal of Biotechnology, № 7, pp. 531–535.

9. *Murashige T.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, № 3. – P. 473–497.

10. *Tawkaz S.* Response of some wheat genotypes to anther culture technique for doubled haploid production / S Tawkaz // M. Sc Thesis. – 2011. – V. 2. – P. 203–212.

11. *Wang P.* A study on the application of C17 medium for anther culture / P. Wang, Y.R. Chen // Acta Bot. Sin. – 1986. – V. 28. – P. 38–45.

References

Ignatova SO, Lobanova KI. Factors, which influence on microspore regeneration potential realization in bread wheat anther culture. Achievements and problems of genetics, breeding and biotechnology. 2007; 2: 492–496.

Lobanova KI, Shestopal OL, Ignatova SO. Abscisic acid as exogenous factor of regeneration ability increasing in bread wheat anther culture. Bulletin of Kharkiv National Agricultural University. 2007; 1(10):102–110.

Markelova TS. Usage of wild wheat and relative species varieties for illness resistant genes introgression. Agro XXI. 2007; 4: 16–18.

Cistué, L, Soriano M, Castillo A M. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Reports. 2006; 25 (4): 257–264.

Datta SK. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. Current Science-Bangalore. 2005; 89 (11): 1870–1872.

Dogramaci-Altuntepe M, Peterson TS, Jauhar PP. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization. J. Hered. 2001; 192 (1): 56–64.

Kao KN, Saleem M, Abrams S. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. Plant Cell Rep. 1991; 9: 595–607.

Khiabani BN, Vedadi C, Rahmani E. Response of some Iranian wheat genotypes to anther culture system. Indian Journal of Biotechnology. 2008; 7: 531–535.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962; 15(3): P. 473–497.

Tawkaz S. Response of some wheat genotypes to anther culture technique for doubled haploid production. M. Sc Thesis. 2011; 2: 203–212.

Wang P, Chen YR. A study on the application of C17 medium for anther culture, Acta Bot. Sin. 1986; 28: 38–45.

Стаття надійшла до редакції 18.05.2016 р.

DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.2(34).71793

УДК 579.864.1:637.136.3/5

І.В. Страшнова, А.І. Матковська, О.В. Басюл

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 68 79 64,
e-mail: fabiyanska@ukr.net

СТВОРЕННЯ І ОЦІНКА БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ЦІННОСТІ КОМПОЗИЦІЙ ЛАКТОБАКТЕРІЙ

Мета. *З'ясувати біотехнологічний потенціал виділених із м'ясної сировини і колекційних штамів лактобактерій та створених за їх участі композицій.* ***Методи.*** *Лактобактерії із зразків м'яса виділяли шляхом пересівів проб у знежирене молоко із наступним пересівом на MRS-агар і бульйон. Колекційні штами попередньо культивували у MRS-бульйоні з 5% вмістом глюкози. Кислотоутворення визначали за активною і титрованою кислотністю; активність зсідання молока – за тривалістю утворення згустку; антагоністичну активність до колекційних умовно-патогенних і патогенних бактерій – лунково-дифузійним методом; внутрішньородовий антагонізм – методом перпендикулярних штрихів; стійкість до NaCl і фенолу при низьких плюсових температурах – за інтенсивністю росту у MRS-бульйоні; стійкість до антибіотиків – дискодифузійним методом.* ***Результати.*** *Із зразків м'ясної сировини виділено штами лактобактерій, котрі характеризувалися диференційними показниками активної і титрованої кислотності, швидкості зсідання молока і своєрідністю утворюваного згустку. Виділені із проб м'яса і колекційні штами лактобактерій мають варіабельну антагоністичну активність щодо тест-штамів S. aureus, E. coli, P. vulgaris, B. cereus, S. enteritidis. Визначено стійкість штамів, лактобактерії до 5,0% і 7,0% NaCl; 0,2% і 0,4% фенолу при культивуванні та антибіотиків. На основі штамів Lactobacillus sp. M6, L. delbrueckii ssp. bulgaricus 444 і L. plantarum 991 було створено 6 варіантів композицій. Найкращу антагоністичну активність, інтенсивність росту при 7,0% NaCl і 0,4% фенолу при 5 °С, стійкість до антибіотиків проявили композиції Lactobacillus sp. M6+ L. delbrueckii ssp. bulgaricus 444 у співвідношенні 2:1 і Lactobacillus sp. M6+L. plantarum 991 у такому ж співвідношенні.* ***Висновки.*** *Отримані результати свідчать про наявність у досліджених штамів лактобактерій біотехнологічних властивостей, вираженість і стабільність яких у композиціях збільшується. Найперспективнішими для промислової апробації є композиції Lactobacillus sp. M6+L. delbrueckii ssp. bulgaricus 444 і Lactobacillus sp. M6+L. plantarum 991 у однакових співвідношеннях 2:1.*

Ключові слова: лактобактерії, біотехнологічні властивості.

Молочнокислі бактерії все частіше цілеспрямовано використовують у різних галузях харчової промисловості. З одного боку, їх можна використову-

вати як стартові культури у технологічних процесах (формування структурно-органолептичних характеристик продуктів), з іншого – як природні консерванти вихідної сировини і готових виробів [1, 2, 11].

Незважаючи на велику кількість бактеріальних препаратів, що успішно використовуються у харчовій промисловості, триває пошук конкурентоздатних культур, на основі котрих, за умов їх детального вивчення, можуть бути створені нові закваски [9]. Добір культур здійснюють декількома шляхами, зокрема виділяють із м'ясної сировини індигенні корисні мікроорганізми, їх ідентифікують і селекціонують з метою використання як стартових культур; використовують колекційні культури тощо [8].

Метою даної роботи було дослідити біотехнологічні властивості виділених із м'ясної сировини і колекційних штамів лактобактерій та розроблених на їх основі композицій.

Матеріали і методи

Виділення лактобактерій із м'ясної сировини здійснювали шляхом 5-ти кратних пересівів проб у стерильне знежирене молоко із наступним пересівом у рідке і на щільне середовища MRS. Біологічні властивості досліджували за стандартними методиками [6]. Для активізації колекційних штамів лактобактерій попередньо проводили посіви у середовище MRS-бульйон, збагачене 5% глюкози.

Кислотоутворення штамів оцінювали за активною і титрованою кислотністю при культивуванні в стерильному знежиреному молоці. Активність зсідання молока визначали за тривалістю утворення згустку [5].

Антагоністичну активність штамів лактобактерій і їх композицій до колекційних умовно-патогенних (*Escherichia coli* УКМ В-906*, Proteus vulgaris* УКМ В-905, *Staphylococcus aureus* ОНУ-223, *Bacillus cereus* ОНУ-67) і патогенних (*Salmonella enteritidis* ОНУ-262) бактерій визначали лунково-дифузійним методом [6].

Внутрішньородовий антагонізм лактобактерій визначали методом перпендикулярних штрихів [6].

Стійкість до 5,0% і 7,0% NaCl; 0,2% і 0,4% фенолу визначали за інтенсивністю росту у MRS-бульйоні, що містив відповідний хімічний агент у зазначених концентраціях, при 5 °С і 10 °С протягом 72 год.

Стійкість до антибіотиків у терапевтичних концентраціях (бензилпеніциліну, цефаклору, тетрацикліну, стрептоміцину і левоміцетину) визначали диско-дифузійним методом [10].

Експерименти здійснювали в трьох повторах. Результати дослідження опрацьовували статистично з використанням програми "Microsoft Office Excel 2003.

Результати та їх обговорення

Оскільки м'ясо і м'ясні вироби є досить сприятливим середовищем для розвитку багатьох груп мікроорганізмів, у тому числі молочнокислих, воно може розглядатися як одне із потенційних джерел виділення лактобактерій [13].

Із 15 зразків м'ясної сировини було ізольовано 6 штамів бактерій, котрі на основі вивчення морфологічних, культуральних, тінкторіальних, фізіолого-біохімічних властивостей ідентифіковано як представники роду *Lactobacillus*. Виділеним штамам присвоєно робочі назви *Lactobacillus sp.* M1, *Lactobacillus sp.* M2, *Lactobacillus sp.* M3, *Lactobacillus sp.* M4, *Lactobacillus sp.* M5, *Lactobacillus sp.* M6.

Ізольовані штами характеризувалися різними показниками кислотоутворення, швидкістю зсідання молока і характером згустку, що утворювався (табл. 1). Отримані дані свідчать, що в залежності від штаму, тривалість зсідання молока варіювала від 4,5 до 7 годин, при цьому згустки, що утворювали 5 штамів (*Lactobacillus sp.* M1, M2, M3, M5 і M6) були щільними і однорідними, штам *Lactobacillus sp.* M4 утворював рихлий згусток з виділення сироватки. Показники титрованої кислотності варіювали від 132,5±1,6 °Т до 145,3±1,4 °Т, активної – від 4,68 до 4,74.

Для подальших досліджень використано свіжо ізольовані із м'яса і колекційні штами бактерій роду *Lactobacillus*.

Таблиця 1

Деякі характеристики виділених із м'ясної сировини штамів лактобактерій

Table 1

Some characteristics of lactobacilli strains isolated from raw meat

Штам	Кислотність		Тривалість зсідання молока, год	Характер згустку, що утворився
	активна, pH	титрована, °Т		
Lactobacillus sp. M1	4,72	132,5±1,6	6	щільний, однорідний
Lactobacillus sp. M2	4,70	138,7±1,4	6	щільний, однорідний
Lactobacillus sp. M3	4,68	143,2±1,3	4,5	щільний, однорідний
Lactobacillus sp. M4	4,74	145,3±1,4	7	рихлий, неоднорідний
Lactobacillus sp. M5	4,70	140,4±1,7	7	щільний, однорідний
Lactobacillus sp. M6	4,71	144,1±1,1	6	щільний, однорідний

Дослідження антагоністичних властивостей штамів лактобактерій здійснювали щодо індикаторних умовно-патогенних (*S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *B. cereus*) і патогенних (*S. enteritidis*) бактерій, вибір яких зумовлений гігієнічними нормативами, зазначеними у державних санітарних нормах та правилах [4].

Отримані результати, наведені у табл. 2, свідчать, що виділеним із м'ясної сировини, і колекційним штамам лактобактерій притаманна антагоністична активність, що проявилось у зонах відсутності росту індикаторних бактерій.

Таблиця 2

Антагоністичні властивості штамів лактобактерій

Table 2

Antagonistic properties of lactobacilli strains

Походження штамів	Штам	Розміри зон відсутності росту індикаторного мікроорганізму, мм				
		S. aureus	**E. coli**	**P. vulgaris**	**S. enteritidis**	**B. cereus**
Виділені із м'ясної сировини	*Lactobacillus sp.* M1	16,3±1,1	23,4±1,3	18,3±1,0	27,6±1,1	10,2±0,5
	Lactobacillus sp. M2	15,1±1,1	23,9±1,5	20,2±1,2	24,4±1,2	5,1±0,1
	Lactobacillus sp. M3	20,7±1,3	20,7±1,4	15,4±1,2	16,5±1,1	0
	Lactobacillus sp. M4	17,5±1,1	21,4±0,8	11,3±0,5	22,7±1,4	7,6±0,2
	Lactobacillus sp. M5	14,1±1,0	18,5±0,3	14,7±0,8	15,1±0,7	3,1±0,2
	Lactobacillus sp. M6	22,2±1,2	23,2±1,1	21,4±0,6	27,4±1,1	12,6±0,4
Колекційні	*L. acidophilus* 900	14,4±1,3	22,6±1,2	18,4±1,1	24,9±1,3	2,3±0.1
	L. casei ssp. tolerans 189	17,5±1,1	20,4±1,4	18,6±0,9	18,5±0,9	0
	L. curvatus 215	17,3±1,2	18,6±0,8	15,2±0,7	22,6±1,1	0
	L. delbrueckii ssp. bulgaricus 444	20,8±1,3	22,3±1,1	22,4±1,2	25,1±1,2	10,7±0,7
	L. plantarum 263	19,5±1,0	21,7±1,2	16,6±0,7	27,4±1,4	6,1±0,2
	L. plantarum 991	23,5±1,1	25,6±1,4	22,3±1,2	24,4±1,0	9,4±0,2

Суттєвих відмінностей у активності свіжевиділених і колекційних штамів молочнокислих бактерій виявлено не було. Найбільш чутливим до метаболітів досліджених лактобактерій виявився штам *S. enteritidis* (зони відсутності росту коливалися від 15,1±0,7 мм до 27,4±1,4 мм). Найстійкішим був штам *B. cereus* (штами *Lactobacillus sp.* M3, *L. casei ssp. tolerans* 189 і *L. curvatus* 215 його ріст взагалі не пригнічували, активність інших штамів була незначною), що пов'язано із природною стійкістю цієї бактерії до несприятливих факторів.

Найбільшими антагоністами до усіх індикаторних умовно-патогенних і патогенних бактерій були штами *Lactobacillus sp.* M6, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444 і *L. plantarum* 991. Розміри зон затримки росту *S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris* і *S. enteritidis* у присутності цих штамів молочнокислих бактерій перевищували 20 мм (рис.).

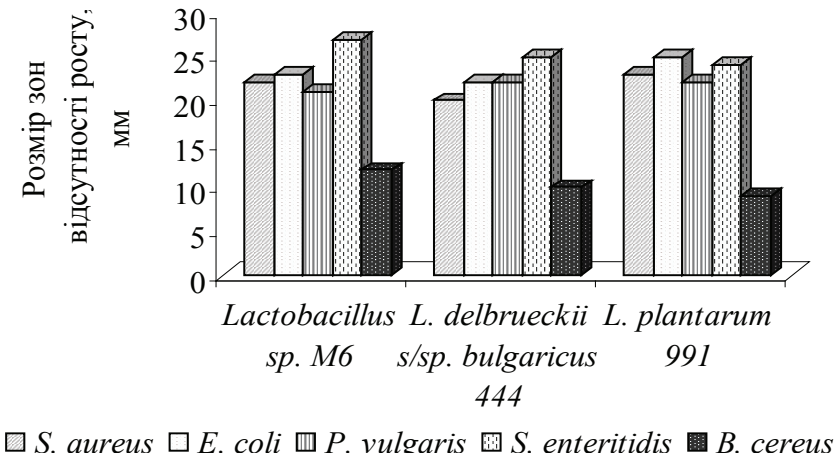


Рис. Антагоністична активність лактобактерій

Fig. Antagonistic activity of lactobacilli

Окрім антагоністичної активності при розробці препаратів для м'ясопереробної промисловості враховуються й інші ознаки молочнокислих бактерій, що характеризують їх виробничу цінність. Це стійкість до низьких плюсових температур, кухонної солі, фенолу і т.п. Відомо, що певні етапи технологічних циклів виготовлення м'ясних виробів відбуваються при низьких температурах у присутності інших чинників.

Результати експериментальних досліджень щодо спроможності лактобактерій до росту при низьких плюсових температурах у присутності NaCl і фенолу наведено у табл. 3.

Отримані дані дають підставу стверджувати, що на виживання і ріст як виділених із м'ясної сировини, так і колекційних штамів лактобактерій суттєво впливає температурний режим інкубації.

Таблиця 3

Стійкість лактобактерій до хімічних чинників при низьких плюсових температурах

Table 3

***Lactobacillus* resistance to chemical factors at low positive temperatures**

Штам	5 °C				10 °C			
	5,0% NaCl	7,0% NaCl	0,2% фенолу	0,4% фенолу	5,0% NaCl	7,0% NaCl	0,2% фенолу	0,4% фенолу
Lactobacillus sp. M1	++	+	+	+	+++	+++	++	+
Lactobacillus sp. M2	++	-	-	-	+++	++	+	-
Lactobacillus sp. M3	+	+	+	-	+++	++	+	+
Lactobacillus sp. M4	+	-	-	-	++	++	-	-
Lactobacillus sp. M5	+	+	+	-	++	++	++	-
Lactobacillus sp. M6	+++	++	++	+	+++	+++	++	++
L. acidophilus 900	++	+	+	+	+++	++	+	+
L. casei ssp. tolerans 189	+	-	-	-	+++	+	+	-
L. curvatus 215	++	+	-	-	+++	++	-	-
L. delbrueckii ssp. bulgaricus 444	+++	++	+	+	+++	+++	++	+
L. plantarum 263	+++	+	+	-	+++	+++	+	+
L. plantarum 991	+++	++	++	+	+++	+++	++	++

Примітка: «+++» – інтенсивність росту висока, «++» – середня, «+» – низька, «-» – відсутність росту.
Note: «+++» – high growth rate, «++» – average growth rate, «+» – low growth rate, «-» – no growth.

Так, за 5 °C у MRS-бульйоні з 7,0% солі лише 3 штами (*Lactobacillus sp.* M6, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444 і *L. plantarum* 991) росли з середньою інтенсивністю, ріст інших штамів або не спостерігався (як то *Lactobacillus sp.* M2, M4, *L. casei ssp. tolerans* 189), або був незначним (виявлено для *Lactobacillus sp.* M1, M3, M5, *L. acidophilus* 900, *L. curvatus* 215 і *L. plantarum* 263). У цей же час за 10 °C за такого самого вмісту солі у середовищі росли усі штами, до того ж *Lactobacillus sp.* M1, M6, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444, *L. plantarum* 263 і 991 – з високою інтенсивністю.

Таблиця 4

Table 4

Антибіотикорезистентність штамів лактобактерій

Antibiotic resistance of lactobacilli strains

Антибіотик	**Розмір зон затримки росту, мм**											
	***Lactobacillus sp.* M1**	***Lactobacillus sp.* M2**	***Lactobacillus sp.* M3**	***Lactobacillus sp.* M4**	***Lactobacillus sp.* M5**	***Lactobacillus sp.* M6**	***L. acidophilus* 900**	***L. casei ssp. tolerans* 189**	***L. curvatus* 215**	***L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444**	***L. plantarum* 263**	***L. plantarum* 991**
Бензилпеніцилін	19,2±0,3	21,8±1,0	20,4±0,6	26,6±0,6	17,4±0,8	14,5±0,5	20,6±1,1	16,8±0,4	13,8±0,4	14,6±0,2	18,7±0,6	12,7±0,3
Цефаклор	14,8±0,7	22,5±1,1	16,9±0,5	24,7±0,9	14,6±0,6	12,3±0,4	14,7±0,8	14,2±0,5	13,8±0,4	14,5±0,4	12,1±0,3	12,4±0,2
Тетрациклін	12,6±0,5	12,5±0,5	9,5 ±0,3	15,7±0,4	14,7±0,5	9,1 ±0,1	14,4±0,4	12,5±0,3	12,1±0,2	10,8±0,2	8,7 ±0,3	10,3±0,3
Стрептоміцин	8,5 ±0,1	10,2±0,1	11,7±0,4	16,6±0,6	14,7±0,3	0	8,7 ±0,4	8,2 ±0,4	12,6±0,5	0	8,2 ±0,5	0
Левоміцетин	6,5 ±0,2	0	6,8 ±0,3	10,2±0,2	12,7±0,5	0	10,7±0,3	8,5 ±0,3	0	0	6,8 ±0,4	0

Досить негативно на досліджених штамах позначилося внесення у середовище фенолу. Навіть у присутності 0,2% цього хімічного агенту ні за 5 °С, ні за 10 °С не росли штами *Lactobacillus sp.* М4 і *L. curvatus* 215. Слід зазначити, що температурний фактор посилював негативний вплив фенолу. За 5 °С виживання і ріст лактобактерій у присутності фенолу були нижчими, ніж за 10 °С. Тим не менш, виявлено штами, які росли у присутності 0,4% фенолу, що за даними науково-технічної літератури характеризує їх як високотолерантні до фенолу [12]. До того ж штами *Lactobacillus sp.* М1, М6, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444 і *L. plantarum* 991 росли при зазначеній концентрації фенолу навіть за 5 °С.

За отриманими даними відзначено, що більш стійкими до фізико-хімічних факторів виявилися штами *Lactobacillus sp.* М6, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444 і *L. plantarum* 991.

Враховуючи, що антибіотики, які використовують для відгодівлі, лікування і профілактики захворювань тварин, можуть накопичуватися у м'ясній сировині [4] і згодом негативно позначитися на мікробіоті заквасок, нами досліджувалася стійкість штамів лактобактерій до найбільш часто використовуваних у тваринництві антибіотиків.

Отримані результати (табл. 4) показують, що усі штами молочнокислих бактерій найбільш чутливими виявилися до бензілпеніциліну, дещо менша чутливість відзначена до цефаклору, що пояснюється природною чутливістю цих бактерій до β-лактамних антибіотиків.

Більшу стійкість лактобактерії проявили до стрептоміцину і левоміцетину. Загалом, усі досліджені штами були або резистентними, або малочутливими до використаних антибіотиків. Найбільшою стійкістю до усіх антибактеріальних препаратів характеризувалися штами *Lactobacillus sp.* М6, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444 і *L. plantarum* 991, зони затримки росту яких не перевищували 14 мм.

В основному у промисловості застосовують препарати, що складаються із 2-х або більше штамів бактерій, оскільки в умовах виробництва такі препарати стабільніші, а бактерії у їх складі доповнюють або підсилюють дію один одного [1].

За результатами проведених досліджень для створення композицій відібрано штами: *Lactobacillus sp.* М6, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444 і *L. plantarum* 991.

При сумісному культивуванні відібраних штамів не спостерігали взаємного пригнічення росту.

З урахуванням отриманих результатів і аналізу відповідних публікацій [1, 9, 11] відібрані бактерії поєднували в таких комбінаціях: 1 – *Lactobacillus sp.* М6+*L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444 у співвідношенні 1:2; 2 – *Lactobacillus sp.* М6+*L. plantarum* 991 – 1:2; 3 – *Lactobacillus sp.* М6+ *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444 – 2:1; 4 – *Lactobacillus sp.* М6+*L. plantarum* 991 – 2:1; 5 – *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444+*L. plantarum* 991 – 1:2; 6 – *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444+*L. plantarum* 991 – 2:1. Усього було досліджено 6 варіантів комбінацій. Визначали ті ж показники, що й при дослідженні кожного штаму окремо.

З'ясовуючи антагоністичний потенціал лактобактерій складених композицій, виявлено, що активність культур лактобактерій зросла (табл. 5).

Таблиця 5

Антагоністична активність лактобактеріальних композицій

Table 5

Antagonistic activity of lactobacilli compositions

Номер композиції	Розмір зони пригнічення росту індикаторного мікроорганізму, мм				
	S. aureus	*E. coli*	*P. vulgaris*	*S. enteritidis*	*B. cereus*
1	25,8±1,4	25,3±1,4	24,6±1,1	30,7±1,5	15,5±1,2
2	25,6±0,9	27,4±1,4	25,2±1,2	30,3±1,2	15,7±1,4
3	27,4±1,2	32,5±1,5	24,4±1,2	31,7±1,3	15,8±1,4
4	29,1±1,1	32,6±1,3	27,3±1,3	35,4±1,2	18,2±1,1
5	26,4±1,2	27,4±1,1	27,7±1,5	29,1±1,0	13,4±1,1
6	24,7±1,3	26,3±1,0	25,3±1,4	28,2±1,2	14,4±1,2

За даними літературних джерел, до посилення антагоністичних властивостей бактерій може призводити як зростання її метаболічних (у тому числі, антимікробних субстанцій) і ростових характеристик, так і дія специфічних індукторів [3].

Найчутливішим до дії метаболітів лактобактерій в композиціях, як і у випадку окремих культур, був штам *S. enteritidis*, найстійкішим – штам *B. cereus*, однак зони відсутності росту індикаторних бактерій були більшими (табл. 2, 5). Найвищу активність до усіх індикаторних бактерій виявили композиції №3 (*Lactobacillus sp.* М6+*L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444 у співвідношенні 2:1) і №4 (*Lactobacillus sp.* М6+*L. plantarum* 991 також у співвідношенні 2:1).

Дослідження росту у консорціумах лактобактерій до NaCl і фенолу при 5 °С показало, що стійкість їх зросла у порівнянні з окремими штамами (табл. 6).

Усі лактобактеріальні композиції росли при максимальних значеннях NaCl (7,0%) і фенолу (0,4%) у середовищі культивування, до того ж ріст більшості з них був не меншим ніж «середньої інтенсивності», що характеризує дані композиції як гало- і фенолотолерантні і вказує на стабільність їхніх ознак

при стресових чинників [1, 12, 14]. Найстійкішими до зазначених хімічних чинників були композиції № 3 і № 4.

Таблиця 6

Стійкість композицій лактобактерій до хімічних чинників при 5 °С

Номер композиції	NaCl		фенол	
	5,0%	7,0%	0,2%	0,4%;
1	+++	++	++	++
2	+++	++	++	++
3	+++	+++	++	++
4	+++	+++	++	++
5	+++	++	++	+
6	+++	++	++	+

Примітка: «+++» – інтенсивність росту висока, «++» – середня, «+» – низька.
Note: «+++» – high growth rate, «++» – average growth rate, «+» – low growth rate.

При дослідженні антибіотикорезистентності (табл. 7), як і при дослідженні інших біотехнологічних властивостей, виявлено посилення цієї ознаки молочнокислих бактерій у композиціях. Незважаючи на те, що лактобактерії залишилися дещо чутливими до β-лактамів і тетрацикліну, однак розміри зон відсутності росту зменшилися (табл. 4, 7).

Таблиця 7

Антибіотикорезистентність лактобактеріальних композицій

Table 7

Antibiotic resistance of lactobacilli compositions

Антибіотик	Розмір зон затримки росту лактобактерій в композиціях, мм					
	1	2	3	4	5	6
Бензилпеніцилін	12,4±0,4	8,5±0,3	8,2±0,3	10,6±0,5	8,4±0,3	12,2±0,2
Цефаклор	12,5±0,5	10,8±0,4	8,2±0,4	8,6±0,7	12,1±0,2	10,7±0,5
Тетрациклін	8,2±0,1	6,4±0,4	8,7±0,3	6,6±0,4	9,2±0,2	8,3±0,3
Стрептоміцин	0	0	0	0	0	0
Левоміцетин	0	0	0	0	0	0

Виявлений факт збільшення антибіотикорезистентності у консорціумах лактобактерій в композиціях молочнокислих бактерій до низки антибіотиків є досить важливою характеристикою їх біотехнологічного потенціалу [10].

Отже, в результаті проведеними дослідженнями виявлено збільшення біотехнологічної активності лактобактерій у складі композицій. Найперспективнішими для подальшого вивчення, у тому числі у промислових умовах, є композиції *Lactobacillus sp.* M6+*L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444 у співвідношенні 2:1 і *Lactobacillus sp.* M6+*L. plantarum* 991 у такому ж співвідношенні.

I.V. Strashnova, A.I. Matkovska, O.V. Basiul

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.:+38 (0482) 68 79 64,
e-mail: fabiyanska@ukr.net

THE CREATION AND THE ASSESSMENT OF THE BIOTECHNOLOGICAL VALUE OF THE LACTOBACILLI COMPOSITION

Summary

Aim. *To determine the biotechnological potential of lactobacilli isolated from raw meat and collection strains and the compositions which were created on their bases.* ***Methods.*** *Lactobacilli isolated from the meat samples through passages in the skim milk sample, followed by passages on MRS-agar and broth. The collection strains were previously precultured in MRS-broth with 5% glucose. The acid production was determined from the active and titratable acidity, the activity of the coagulation of milk – on the duration of clot formation, the antagonistic activity to the collection opportunistic and pathogenic bacteria – the well-diffusion method, withingenus antagonism – the method of perpendicular grooves, the resistance to NaCl and phenol at low positive temperatures – on the growing rate in MRS-broth, the antibiotic resistance – the disk diffusion method.* ***Results.*** *The strains of lactic acid bacteria were isolated from the raw meat. The isolated strains are characterized by different indicators of active and titratable acidity, the coagulation rate of milk and the originality formed clot. Both isolated from meat samples, and collection strains of lactobacilli showed a variable antagonistic activity to test-strains of S. aureus, E. coli, P. vulgaris, B. cereus, S. enteritidis. Depending on the strain lactobacilli showed the resistance (it was shown in the different growth rate), or sensitivity to 5.0% and 7.0% NaCl; 0.2% and 0.4% phenol by culturing at 5 °C and 10 °C. The investigated lactobacilli were either resistant or weakly sensitive to the antibiotics which were used. Based on strains of Lactobacillus sp. M6, L. delbrueckii ssp. bulgaricus 444 and L. plantarum 991 with more pronounced properties were created 6 variants of compositions which were determined for the same properties as the individual strains.The highest antagonistic activity, the growth rate in 7.0% NaCl and 0.4% phenol at 5 °C, the antibiotic resistance were showed by the compositions of Lactobacillus sp. M6+L. delbrueckii ssp. bulgaricus 444 in the ratio 2:1 and Lactobacillus sp. M6+L. plantarum 991 in the same ratio.* ***Conclusions.*** *The obtained results of the tested strains indicate the presence of lactic acid bacteria needed for the meat industry biotechnological properties, the extent and stability of which is increased in the compositions. The most promising for the industrial testing*

are compositions of Lactobacillus sp. M6+L. delbrueckii ssp. bulgaricus 444 and Lactobacillus sp. M6+L. plantarum 991 in the same ratio of 2:1.

Key words: Lactobacillus strains and compositions, biotechnological properties, meat processing industry.

И.В. Страшнова, А.И. Матковская, Е.В. Басюл

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 68 79 64,
e-mail: fabiyanska@ukr.net

СОЗДАНИЕ И ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ КОМПОЗИЦИЙ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

Реферат

Цель. *Определить биотехнологический потенциал выделенных из мясного сырья и коллекционных штаммов лактобактерий и созданных на их основе композиций.* ***Методы.*** *Лактобактерии из образцов мяса выделяли путем пересевов проб в обезжиренное молоко с последующим пересевом на MRS-агар и бульон. Коллекционные штаммы предварительно культивировали в MRS-бульоне с 5% содержанием глюкозы. Кислотообразование определяли по активной и титруемой кислотности; активность свертывания молока – по продолжительности образования сгустка; антагонистическую активность к коллекционным условно-патогенным и патогенным бактериям – луночно-диффузионным методом; внутриродовой антагонизм — методом перпендикулярных штрихов; устойчивость к NaCl и фенолу при низких плюсовых температурах – по интенсивности роста в MRS-бульоне; устойчивость к антибиотикам — диско-диффузионным методом.* ***Результаты.*** *Из образцов мясного сырья выделены штаммы лактобактерий, характеризовавшиеся дифференциальными показателями активной и тируемой кислотности, скорости свертывания молока и своеобразием образуемого сгустка. Выделенные из проб мяса и коллекционные штаммы лактобактерий проявили вариабельную антагонистическую активность в отношении тест-штаммов S. aureus, E. coli, P. vulgaris, B. cereus, S. enteritidis. Определена устойчивость штаммов, лактобактерии к 5,0% и 7,0% NaCl; 0,2% и 0,4% фенола к антибиотикам. На основе штаммов Lactobacillus sp. M6, L. delbrueckii ssp. bulgaricus 444 и L. plantarum 991 создано 6 вариантов композиций. Наибольшую антагонистическую активность, интенсивность роста при 7,0% NaCl и 0,4% фенола при 5 °С, устойчивость к антибиотикам проявили композиции Lactobacillus sp. M6+L. delbrueckii ssp. bulgaricus 444 в соотношении 2:1 и Lactobacillus sp. M6+L. plantarum 991 в таком же соотношении.* ***Выводы.*** *Полученные результаты свидетельствуют о наличии в исследуемых штаммах лактобактерий биотехнологических свойств, необходимых для пищевой отрасли, выраженность и стабильность которых в композициях увеличивается. Наиболее перспективными для промышленной апробации являются композиции Lactobacillus sp. M6+L. delbrueckii ssp. bulgaricus 444 и Lactobacillus sp. M6+L. plantarum 991 в одинаковых соотношениях 2:1.*

Ключевые слова: лактобактери, биотехнологические свойства.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Баль-Прилипко Л.В., Леонова Б.И.* Аналитический скрининг путей применения бактериальных препаратов в производстве мясных изделий // Научный результат. – 2015. – № 3. – С. 37–44.

2. *Басюл О.В., Ямборко Г.В., Іваниця В.О.* Вплив складу захисних середовищ на збереження життєздатності та біотехнологічні властивості ліофілізованих бактерій *Lactobacillus plantarum* ONU 315 // Вісник ОНУ. – 2014. – Т. 19. – Вип. 1 (34). – С. 7–13.

3. *Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В.* Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2010. – 12, № 4. – С. 347–352.

4. *Державні* санітарні норми та правила «Медичні вимоги до якості та безпечності харчових продуктів та продовольчої сировини». – К., 2014. – 11 с.

5. *Крусь Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В.* Методы исследования молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 2000. – 386 с.

6. *Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н. и др.* Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. – М.: Академия, 2005. – 608 с.

7. *Соловьева А.А., Зинина О.В., Ребезов М.Б. и др.* Актуальные биотехнологические решения в мясной промышленности // Молодой ученый. – 2013. – № 5. — С. 105–107.

8. *Страшнова І.В.* Пробіотичні властивості штамів лактобактерій після тривалого зберігання у ліофілізованому стані // Наукові праці ОНАХТ. – 2011. – Т. 2. – Вип. 40. – С. 180–185.

9. *Ammor M.S., Mayo B.* Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update // Meat science – 2007. – 76 (1). – P. 138–46.

10. *Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K.* Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli // J. Food Prot. – 2001. – V. 64 (12). – P. 2007–14.

11. *Kröckel L., Dederer I., Troeger K.* Starter and Protective Cultures for Meat Products // Fleischwirtschaft. – 2011. – 91 (3). – P. 93–98.

12. *Park H.S., Lee S.H., Uhm T.B.* Selection of microorganisms for probiotic and their characterization // Kor. J. Food Nutr. – 1998. – V. 27. – P. 433–440.

13. *Sanders M.E.* Probiotics: definition, sources, selection and uses // Clin. Infect. Dis. – 2008. – 46. – P. 58–61.

14. *Wedajo B.* Lactic Acid Bacteria: Benefits, Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food // J. Prob. Health. – 2015. – P. 3–129.

REFERENCES

1. Bal'-Prilipko LV, Leonova BI. Analiticheskii skrining putey primineneniya bacterialnih preparatov v proizvodstve myasnih izdeliy. Nauhnii rezultat. 2015; (3): 37—44.

2. Basiul OV, Yamborko GV, Ivanytsia VO. Vpliv skladu zahisnih seredovisch na zberezhennya zhittezdatnosti ta biotehnologichni vlastivosti liofilizovanix bakteriy *Lactobacillus plantarum* ONU 315. Visnik ONU. 2014; 19, 1(34): 7—13.

3. Bucharin OV, Semenov AV, Cherkasov SV. Harakteristika antagonisticheskoy aktivnosti probioticheskih bakteriy pri ih vzaimodeystvii. Klin. mikrobiol. antimikrob. himioter. 2010; 12(4): 347—352.

4. Derzhavni sanitarni normi ta pravila "Medichni vimogi do yakosti ta bezpechnosti harchovih produktiv ta prodovolchoyi sirovini". Kiyiv, 2014. 11.

5. Krus' GN, Shaligina AM, Volokitina ZV. Metodi issledovaniya moloka i molochnih productov. Moskva: Kolos, 2000. 386.

6. Netrusov AI, Egorova MA, Zaharchuk LM, Kolotilova NN i dr. Praktikum po mikrobiologii: uchebnoe posobie dlya studentov visshich uchebnih zavedeniy. Moskva: Akademiya, 2005. 608.

7. Solov'eva AA, Zinina OV, Rebezov MB i dr. Aktualnie biotehnologicheskie resheniya v myasnoi promishlennosti. Molodoi ucheniy. 2013; 5: 105—107.

8. Strashnova IV. Probiotichni vlastivosti shtamiv laktobakteriy pislya trivalogo zberigannya u liofilizovanomu stani. Zbirrnik Naukovih prats' ONAHT. 2011; 2(40): 180—185.

9. Ammor MS, Mayo B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat science. 2007; 76(1): 138—46.

10. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. J. Food Prot. 2001; 64(12): 2007—14.

11. Kröckel L, Dederer I, Troeger K. Starter and Protective Cultures for Meat Products. Fleischwirtschaft. 2011; 91(3): 93—98.

12. Park HS, Lee SH, Uhm TB. Selection of microorganisms for probiotic and their characterization. Kor. J. Food Nutr. 1998; 27: 433—440.

13. Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection and uses. Clin. Infect. Dis. 2008; 46: 58—61.

14. Wedajo B. Lactic Acid Bacteria: Benefits, Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food. J. Prob. Health. 2015: 3—129.

Стаття надійшла до редакції 30.05.2016 р.

DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.2(34).72067

УДК 606:662.7:[546.3+504]

І.А. Блайда, Т.В. Васильєва, В.Ф. Хитрич, Н.Ю. Васильєва, О.І. Джамбек, О.А. Джамбек

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 746 51 02,
e-mail: iblayda@ukr.net

ФІЗІКО-ХІМІЧНА ТА МІКРОБІОЛОГІЧНА ХАКТЕРИСТИКА ПОРОДНИХ ВІДВАЛІВ ЗБАГАЧЕННЯ ВУГІЛЛЯ

Мета. *Вивчення фізико-хімічних та мікробіологічних особливостей техногенних субстратів в залежності від часу їх зберігання.* ***Методи***. *Атомно-емісійна і атомно-абсорбційна спектроскопія, потенціометричний метод і авторська запатентована електрохімічна комірка, стандартний мікробіологічний метод накопичувальних культур.* ***Результати***. *Встановлено, що в відвалах при тривалому зберіганні відбувається концентрування за більшістю складових і окиснення йонів металів сировини до вищого ступеня з утворенням більш стійких рівноважних структур. Показано вплив власної мікробіоти субстратів відвалів на їх стійкість в процесі переробки. Отримано і кількісно оцінено накопичувальні культури мікроорганізмів різних фізіологічних груп, які формують мікробіоценоз субстратів. Встановлено кількісне переважання представників основних груп ацидофільних хемолітотрофних бактерій, як мезофільних, так і помірно термофільних, власної мікробіоти відвалів з тривалим часом зберігання, що призводить до більш вираженого прояву впливу біоценозу на фізико-хімічні характеристики цих субстратів.* ***Висновки***. *В процесі накопичення та зберігання відвалів у їх складі відбуваються значні фізико-хімічні та мікробіологічні зміни, які повинні враховуватися при виборі умов утилізації цих техногенних субстратів біотехнологічними методами з використанням активності представників власної мікробіоти.*

Ключові слова: відвали, мікробіота, вилуговування, ацидофільні хемолітотрофні бактерії.

Попередні дослідження [1, 6, 15] показали, що породні відвали Центральної збагачувальної фабрики (ЦЗФ) «Червоноградська» ПАТ «Львівська вугільна компанія» можуть розглядатися як джерело отримання цінного рідкісного металу германію сучасними біотехнологічними методами шляхом використання активності мікроорганізмів аборигенної мікробіти. ЦЗФ збагачує кам'яне вугілля шахт Львівсько-Волинського вугільного басейну гравітаційним і флотаційним методами, є найбільшою збагачувальною фабрикою у Європі.

За термін своєї діяльності ЦЗФ накопичила десятки мільйонів тон відвалів. Основний породний відвал ЦЗФ має висоту більш 60 метрів, займає площу близько 75 га і має відсипки породи, які відрізняються за кольором: червоний – з тривалим часом зберігання, чорний – з коротким (рис. 1).

Нами було встановлено, що у своїй загальній масі за мінералогічним, хімічним, дисперсним складом породні відвали ЦЗФ «Червоноградська» є дуже складною сировиною, екологічно небезпечною за рахунок підвищених концентрацій токсичних компонентів і важких металів, а також цінною з точки зору вилучення рідкісних та кольорових металів [4, 5]. Відвали мають перспективу для отримання рідкісного металопродукту та знешкодження шляхом використання для їх переробки сучасного екологічно безпечного біотехнологічного методу.

Рис.1. Породний відвал ЦЗФ «Червоноградська»

Fig. 1. The waste dumps of "Chervonogradska" CCF

Запропонована авторами біотехнологія переробки породних відвалів ЦЗФ передбачає використання корисних окиснювальних властивостей власної мікробіоти відвалів по відношенню до цінних та важких металів. Було встановлено [5], що під впливом певних техногенних і природних чинників у процесі утворення, складування та зберігання в досліджуваних техногенних екосистемах формується особливе за своїм складом аборигенне співтовариство, яке представлене переважно гетеротрофними і ацидофільними хемолітотрофними бактеріями. В процесі зберігання у відвалах під впливом зовнішніх чинників (вологість, атмосферний кисень, вітер, температура і ін.) відбуваються зміни фізико-хімічних та мікробіологічних властивостей, що впливають на мікробіоценоз і на здатність сформованих рівноважних структур, які представлені в основному аргілітом алевролітістим (з переважанням монтморилоніту), каолінітом, кварцовим мінералом типу пісковика, піритом [6], до деструкції.

Мета роботи – встановлення особливостей фізико-хімічних та мікробіологічних властивостей породних відвалів збагачення вугілля відвалів Центральної збагачувальної фабрики «Червоноградська» залежно від часу їх зберігання.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували зразки відвалів вуглезбагачення ЦЗФ «Червоноградська», які відрізнялися часом збереження в природних умовах: червоний – з тривалим (понад 6 місяців); чорний – з коротким (менше за 6 місяців). Кількісний аналіз твердих субстратів здійснювали на атомно-емісійному спектрометрі ЭМАС-200 CCD. Хімічний аналіз розчинів на вміст металів здійснювали із застосуванням методу спектроскопії атомної абсорбції на приладах AAS-1 и С-115ПК Selmi [13]. Для вимірювання окиснювально-відновного потенціалу (Eh, мВ) і pH використовували потенціометричний метод і авторську запатентовану електрохімічну комірку [16]. Вимірювання проводили за допомогою pH-метру InoLab. Межа основної абсолютної похибки становить ±0,05 (для pH) і ±5 мВ (для Eh). Дослідження проводили з природним (з власною мікробіотою) та автоклавованим (без мікробіоти) субстратом, при співвідношенні твердого до рідкого субстрату Т:Р=1:10, за температури 24,0±0,5 °С. В роботі використовували мезофільний штам MFLv37, який був ідентифікований за допомогою класичних мікробіологічних методів як *Acidithiobacillus ferrooxidans* [7], виділений з відвалу Львівсько-Волинського вугільного басейну, найбільш активний, який швидко росте. Його додавали до розчину для прискорення процесу біовилуговування цінних і важких металів.

Для визначення впливу власної мікробіоти субстратів на процес вилуговування металів використовували, як вилуговуючі реагенти, воду (pH 5,6) і сірчанокислий розчин (pH 1,4), дослідження проводили за температури 24,0±0,5 і 80,0±0,5 °С, співвідношення Т:Р=1:4, терміну вилуговування (τ) 4 години. За контроль слугували попередньо автоклавовані мінеральна сировина і реактиви.

Для виявлення різних фізіологічних груп мікроорганізмів власної мікробіоти використовували метод накопичувальних культур. Інкубування проб проводили на відповідних стандартних живильних середовищах за загальними мікробіологічними методиками [2, 8, 10, 11]. Для виявлення представників хемолітотрофних ацидофільних бактерій використовували середовища 9К і 9К*, нейтрофільних хемолітотрофних – середовище Бейєрінка, для представників роду *Leptospirillum* – середовище 882 [8, 10], для помірно термофільних представників роду *Acidithiobacillus* – середовище 150а [8, 10], для гетеротрофних – середовище Горбенко, для міцеліальних грибів – середовище Чапека, для «силікатних» – середовище А-27.

Статистичне опрацювання даних здійснювали стандартними методами; достовірність отриманих результатів оцінювали за критерієм Стьюдента з вірогідністю Р <0,05.

Результати та їх обговорення

Аналіз даних хімічного складу відвалів, наведених у таблиці 1, свідчить про те, що основними породоутворювальними елементами в обох субстратах є кремній, алюміній, залізо і сірка, що формують досить стійкі алюмосилікатні, сульфідні і оксидні структури. Однак в червоних відвалах при тривалому зберіганні за рахунок вивітрювання складових компонентів відбувається концентру-

Таблиця 1

Хімічний склад породних відвалів ЦЗФ «Червоноградська»

Table 1

Chemical compound of the "Chervonogradska" CCF waste dumps

Елемент	Клас небезпеки	ГДК для ґрунту, мг/кг	Промислові концентрації, мг/кг [12, 14]	Виявлені концентрації, мг/кг	
				Чорний	Червоний
1	2	3	4	5	6
Мідь	2	3,0	45,0-60,0	62,18±0,05	78,90±0,05
Цинк	1	23,0	65,0-70,0	112,52±0,05	130,87±0,05
Марганець	3	$1,5 \cdot 10^3$	$850,0 – 10^3$	317,72±0,05	812,86±0,05
Свинець	1	30,0	18,0-22,0	42,20±0,05	57,92±0,05
Нікель	2	4,0	80,0-120,0	134,20±0,05	132,90±0,05
Кадмій	1	2,0	45,0-55,0	2,82±0,05	3,63±0,05
Залізо	немає	$3,7 \cdot 10^3$	$(1,5\text{-}2,0) \cdot 10^3$	$(44,57 \pm 0,05) \cdot 10^3$	$(128,30 \pm 0,05) \cdot 10^3$
Олово	2	4,5	90,0-120,0	351,9±0,1	587,5±0,1
Хром	2	6,0	190,0-210,0	99,1±0,1	76,2±0,1
Ванадій	3	150,0	140,0 -160,0	150,0±0,1	162,1±0,1
Кобальт	2	12,0	37,0-42,0	116,1±0,1	188,8±0,1

Прожовження таблиці 1

1	2	3	4	5	6
Алюміній	немає	даних немає	$(2,5\text{-}5,0)\cdot 10^3$	$(13,9\pm0,1)\cdot 10^3$	$(8,9\pm0,1)\cdot 10^3$
Сірка	немає	160,0	даних немає	$(11,7\pm0,1)\cdot 10^3$	$(56,5\pm0,1)\cdot 10^3$
Кремній	немає	даних немає	даних немає	$(158,6\pm0,1)\cdot 10^3$	$(104,2\pm0,1)\cdot 10^3$
Галій	немає	даних немає	10,0-15,0	12,1±0,1	14,5±0,1
Германій	немає	даних немає	5,0-7,0	26,0±0,1	30,0±0,1
Цирконій	немає	даних немає	160,0-220,0	173,0±0,1	178,0±0,1
Ніобій	немає	даних немає	19,0-22,0	14,0±0,1	15,0±0,1
Лантан	немає	даних немає	25,0-29,0	48,0±0,1	50,2±0,1
Церій	немає	даних немає	25,0	69,0±0,1	71,0±0,1
Рубідій	немає	даних немає	90,0	141,0±0,1	165,9±0,1
Стронцій	3	даних немає	80,0	211,0±0,1	234,7±0,1
Барій	3	даних немає	250,0-400,0	519,0±0,1	587,5±0,1
Берилій	1	2,0	3,8-50,0	50,55±0,05	62,18±0,05
Титан	немає	даних немає	$4,0\cdot 10^3$	$(4,19\pm0,05)\cdot 10^3$	$(5,03\pm0,05)\cdot 10^3$
Кальцій	немає	даних немає	даних немає	$(17,2\pm0,1)\cdot 10^3$	$(35,9\pm0,1)\cdot 10^3$
Калій	немає	даних немає	даних немає	$(134,1\pm0,1)\cdot 10^3$	$(94,1\pm0,1)\cdot 10^3$

вання за деякими породоутворювальними елементами і елементами-домішками. При термообробці (t=200±10 °С протягом 3 год в потоці повітря) червоний зразок втрачає до 10% маси, а чорний – до 1%. Це відбувається переважно за рахунок видалення вологи, якої в червоному зразку набагато більше у зв'язку з тривалістю зберігання. Тому можна припустити, що під впливом вологого повітря при тривалому зберіганні в червоному зразку відвалів відбувається крім насичення незв'язаною водою, окиснення металів техногенної сировини (Fe^{2+}, Mn^{2+} та інш.) до вищого ступеня з утворенням більш стійких (порівняно з чорним) рівноважних структур.

Для того, щоб прогнозувати спрямованість і результативність протікання реакцій і, як кінцевий результат, управляти процесом і інтенсифікувати його, треба вивчити зміни pH і Eh в системах, що досліджували, оскільки ці показники є характеристиками співвідношень окисненої і відновленої форм для кожного компонента середовища, тобто ступеня активності електронів в окисно-відновних реакціях (реакціях, що пов'язані з приєднанням або передачею електронів). Залежності pH і Eh вивчали в системах із розчинами: А – 0,1н H_2SO_4 (pH=1,4); Б – 0,1н H_2SO_4 + 5 г/дм^3 $Fe_2(SO_4)_3 \times 7H_2O$ + 1 г/дм^3 $FeSO_4 \times 7H_2O$; В – живильне середовище 9К з $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 44,2 г/дм^3 (pH – 1,6÷1,8); Г – середовище 9К з $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 44,2 г/дм^3 + штам MFLv37 (у кількості 20% (об.)).

Аналіз даних (рис. 2) показує значні відмінності значень і характеру ходу кривих залежності pH від часу вилуговування між червоним і чорним відвалами.

Так, в чорному субстраті спостерігається тенденція значного зростання pH від часу (з більшою швидкістю) з досягненням величин pH 3,20 (рис. 2в), для червоного субстрату хід кривих більш плавний і рівномірний з максимальними значеннями pH 2,25 (рис. 2а), що є підтвердженням і наслідком рівноваги в червоному субстраті. Введення до складу розчину А солей заліза знижує швидкість зростання pH в ~ 1,5–2 рази для чорного зразка і практично не позначається для червоного. Живильне середовище 9К з більшим вмістом Fe^{2+} (розчин В) характеризується різким зростанням pH в перші 3–4 доби до максимальних значень 3,30 (для чорного) і 2,35 (для червоного субстрату) з подальшим плавним зниженням до рівноважних значень. Присутність бактерій в розчині 4 збільшує швидкість зростання pH як для чорного, так і для червоного зразків сировини по відношенню до розчину В за рахунок активного руйнування поверхневих шарів твердого субстрату під впливом діяльності бактерій. В результаті будь-яка з систем прагне до рівноважних значень pH, які на 12–14 добу експерименту відповідають для більш рівноважного червоного субстрату діапазону pH = 1,6 ÷ 2,2, для менш рівноважного чорного субстрату діапазону pH = 2,2 ÷ 2,6 .

Меншою мірою хід кривих змінюється при переході від субстрату з власною мікробіотою до субстрату автоклавованого. Основна відмінність полягає в тому, що в субстратах без мікробіоти криві швидше виходять на рівноважні значення pH, не мають настільки виражених максимумів (червоний субстрат) або не досягають максимальних значень, зафіксованих для субстратів з мікробіотою (чорний зразок). Це є підтвердженням безпосередньої участі і впливу груп мікроорганізмів, які формують власну мікробіоту субстратів, на процеси,

які протікають в досліджуваних системах. І цей вплив більше виражений в червоних відвалах.

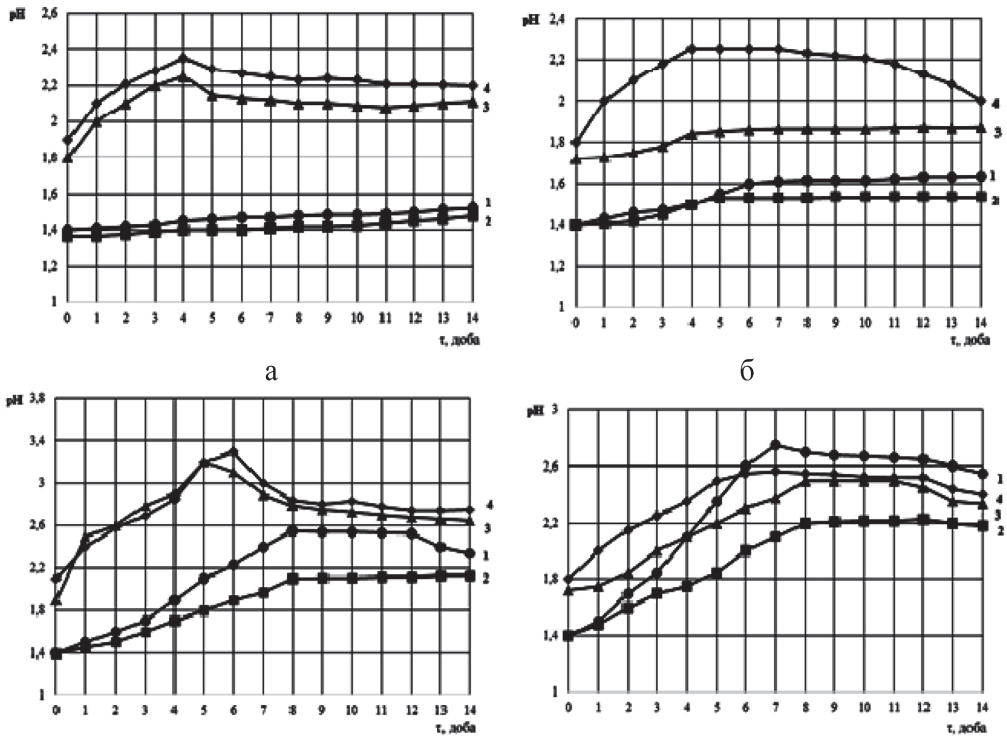


Рис. 2. Залежність pH від часу вилуговування для червоного (а, б) та чорного (в, г) субстратів: а, в – з мікробіотою; б, г – без мікробіоти

(склад розчинів А–Г відповідає номерам кривих)

Fig. 2. Dependence of pH against leaching time for the red (а, б) and black (в, г) waste dumps: а, в – with microorganisms; б, г – without microorganisms

(the composition of the solutions А–Г were correspond to the numbers of curves)

Виходячи зі складу досліджуваних субстратів і розчинів, можна припустити, що в цілому залежності pH і Eh систем від часу, які спостерігаються, будуть визначатися зміною ступеня окиснення заліза (що входить до складу субстратів і живильних середовищ) в ході протікання паралельних процесів:

(1) – перехід йонів Fe^{2+} з відвалу в розчин в результаті взаємодії з H_2SO_4;

(2) – окиснення Fe^{2+} бактеріями або киснем повітря до Fe^{3+} по реакції

$$2Fe^{2+} + 1/2O_2 + 2H^+ \leftrightarrow 2Fe^{3+} + H_2O;$$

(3) – гідроліз солей Fe^{3+} з утворенням малодисоційованих йонів $(FeOH)^{2+}$;

(4) – відновлення бактеріями Fe^{3+} до Fe^{2+} до настання рівноваги $Fe^{3+} \leftrightarrow Fe^{2+}$.

По суті, процеси (2) і (4) є зворотними: із збільшенням кислотності (зменшенням pH) рівновага (2) зміщується в бік утворення Fe^{3+} і навпаки. Крім того,

відомо [6], що бактеріальні процеси за участю ацидохемолітотрофних бактерій уповільнюються з ростом pH і практично припиняються при pH≥5,0, що так само позначається на спрямованості процесів (2) і (4).

Отже, для чорного зразка з більшим вмістом йонів Fe^{2+} всі процеси протікають більш інтенсивно (рис. 2 в, г) з переходом до вищих значень pH в результаті переважання процесу (1). Після досягнення максимумів у всіх системах величина pH починає знижуватися до рівноважних значень в результаті протікання процесів (2) – (4). Величина pH стабілізації залежить від співвідношення Fe^{2+}/ Fe^{3+} в розчині.

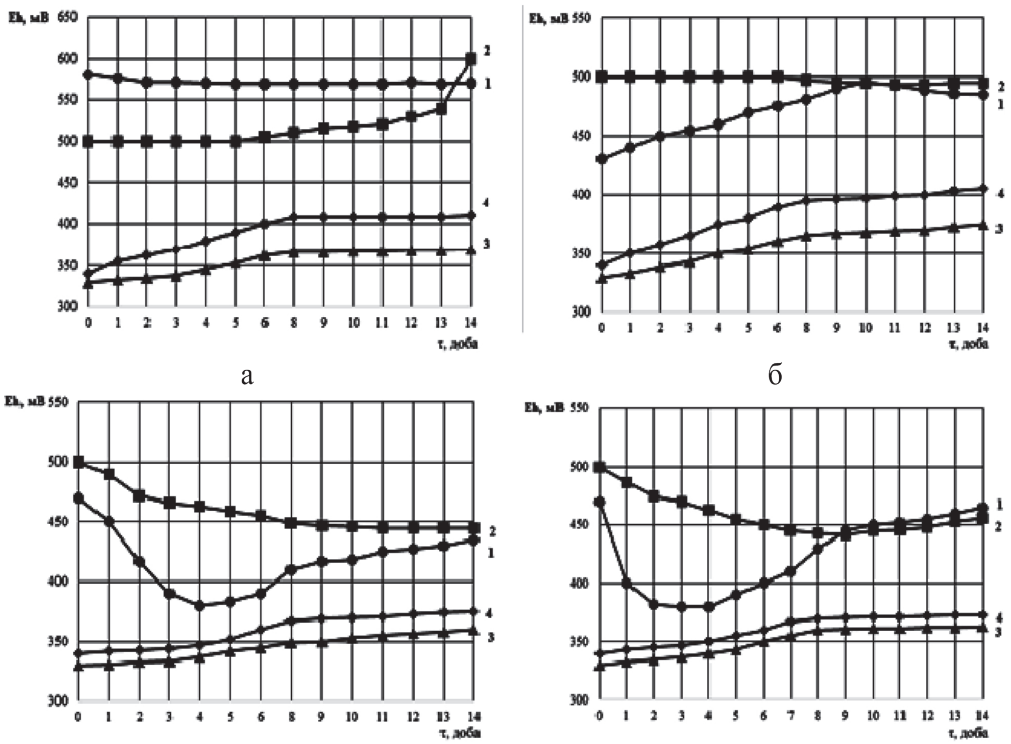


Рис. 3. Залежність Eh від часу вилуговування для червоного (а, б) та чорного (в, г) субстратів: а, в – з мікробіотою; б, г – без мікробіоти

(склад розчинів А–Г відповідає номерам кривих)

Fig. 3. Dependence of Eh against leaching time for the red (а, б) and black (в, г) waste dumps: а, в – with microorganisms; б, г – without microorganisms

(the composition of the solutions А–Г were correspond to the numbers of curves)

На величину потенціалу системи значно впливає склад розчину для вилуговування (рис. 3), меншою мірою – природа субстрату (червоний або чорний) та наявність власної мікробіоти. При цьому йони заліза, яких в вихідній сировині та живильному середовищі міститься значна кількість, є потенціал визначальним, оскільки і окиснена, і відновлена форма перебувають в розчині. Реальний потенціал пари Fe^{3+}/Fe^{2+}, який відповідає рівновазі $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$, для хлорсрібного електрода порівняння розраховується за рівнянням:

$$E_{Fe^{3+}/Fe^{2+}} = E^{\circ}_{Fe^{3+}/Fe^{2+}} + 0{,}059 \lg (a_{Fe^{3+}}/a_{Fe^{2+}}) - E_{AgCl} \quad (5)$$

де $E^{\circ}_{Fe^{3+}/Fe^{2+}} = 0{,}771$ В – стандартний електродний потенціал при $a_{Fe^{3+}} = a_{Fe^{2+}} = 1$; $E_{AgCl} = 0{,}222$ В – потенціал хлорсрібного електрода порівняння в насиченому розчині KCl при 25°C і $a_{H^+} = 1$. Значення Eh, більш ніж 0,549 В, вказує на перевагу Fe^{3+} в розчині, а значення менше за дану величину – на перевагу Fe^{2+}.

В розчинах А та Б хід кривих для обох субстратів має тенденцію до зниження з досягненням рівноваги або проходженням через мінімум, що пов'язано з розчиненням внутрішніх шарів даних зразків відвалу, які містять більше йонів Fe^{2+}. Ця тенденція більше виражена для чорного зразка. В розчинах В і Г (до складу яких входить значна кількість Fe^{2+}) обидва субстрати поводять себе однаково: Eh поступово зростає до рівноваги, але з різними термінами стабілізації. Наведені результати свідчать про виражений вплив сформованої мікробіоти відвалів на рівновагу та стійкість досліджуваних систем. Якщо говорити про вплив тривалості зберігання субстрату на формування в ньому специфічної власної мікробіоти, то можна відзначити тенденцію більш вираженого прояву біоценозу в червоних відвалах.

У табл. 2 і 3 наведені результати розрахунків коефіцієнта (К) впливу власної мікробіоти на вилучення металів у розчин для чорного і червоного субстратів. Формула його розрахунку наведена у таблиці 2 і 3. Незалежно від умов проведення процесу вилуговування існує значний вплив мікроорганізмів на ефективність процесу в цілому. Збільшення коефіцієнта впливу на показники процесів при підкисленні вилуговуючого розчину свідчить на користь присутності та активізації представників власних ацидофільних мікроорганізмів. При збільшенні температури процесу також зростає величина К, що згідно з даними літератури, пов'язано з діяльністю термофільних мікроорганізмів [2, 3].

Зміна pH розчинів під час проведення експериментів є також прикладом прояву активності власної мікробіоти сировини. При вилуговуванні металів із досліджуваного продукту водою зміщення pH спостерігається у бік закислення порівняно з вихідним середовищем. Зменшення показника pH при високій температурі є більш вираженим. Це пов'язано із присутністю у сировині слабко кислих оксидів та інших сполук заліза, цинку, свинцю і германію, які при розчиненні у воді створюють у результаті гідролізу слабкі мета- і ортокислоти типу H_2GeO_3, при чому рівновага процесу $GeO_2 + H_2O \leftrightarrow HGeO_3^- + H^+$ при нагріванні зміщується у бік створення цих кислот [14]. Однак у нестерильних продуктах за присутності власної мікробіоти це зміщення менш вираженим. За умов, що активізують діяльність ацидофільних мезофільних тіонових бактерій (pH 1,4 при t = 80±0,5 °C), реєстрували різке зміщення значень pH у нейтральну область (табл. 2, 3). Таким чином, за всіх умов досліджень спостерігається наявний вплив власної мікробіоти на вилучення металів у розчин для чорного і червоного субстратів, і для червоного зразка ця перевага більше виражена (К досягає 1,57÷2,22).

Таблиця 2

Вплив власної мікробіоти чорного зразка відвалу на процес вилуговування

Table 2

The effect of own microbiota of the black sample dump on leaching process

Умови біовилуговування	pH розчину після вилуговування		Коефіцієнт впливу мікроорганізмів на вилучення металів, К $К = Е_{н/а}/Е_а$*				
	$pH_{н/а}$	$pH_а$	Ge	Ga	Fe	Pb	Zn
H_2O (pH 5,6) t = 24±0,5 °C	3,8	3,2	**1,37** 6,15/4,49	**1,42** 5,96/4,20	**1,39** 6,75/4,86	**1,32** 5,78/4,38	**1,41** 5,25/3,72
H_2O (pH 5,6) t = 80±0,5 °C	3,6	3,1	**1,39** 12,95/9,32	**1,43** 10,14/7,09	**1,37** 13,15/9,60	**1,29** 11,60/8,99	**1,39** 8,34/6,00
H_2SO_4(pH 1,4) t = 80±0,5 °C	7,0	2,9	**2,04** 18,17/8,91	**1,93** 17,96/9,30	**2,13** 21,46/10,08	**1,54** 18,14/11,78	**2,01** 17,46/8,69

*$Е_{н/а}$ ($pH_{н/а}$) і $Е_а$ ($pH_а$) – відповідно ступінь вилучення металу (pH розчину) з вихідного продукту неавтоклавованого (н/а) і після автоклавування (а), %

* $E_{n/a}$ ($pH_{n/a}$) and E_a (pH_a) – in accordance with the degree of extraction metal (pH of solution) of the original product not autoclaving (n/a) and after autoclaving (a), %

Таблиця 3

Вплив власної мікробіоти червоного відвалу на процес вилуговування

Table 3

The effect of own microbiota of the red sample dump on leaching process

Умови біовилуговування	pH розчину після вилуговування		Коефіцієнт впливу мікроорганізмів на вилучення металів, К $К = Е_{н/а}/Е_а$*				
	$pH_{н/а}$	$pH_а$	Ge	Ga	Fe	Pb	Zn
H_2O (pH 5,6) t = 24±0,5 °C	4,0	3,3	**1,47** 5,45/3,71	**1,52** 5,07/3,34	**1,49** 6,05/4,06	**1,50** 4,98/3,32	**1,49** 5,15/3,46
H_2O (pH 5,6) t = 80±0,5 °C	3,7	3,0	**1,40** 11,05/7,89	**1,47** 9,44/6,42	**1,39** 13,05/9,39	**1,41** 11,20/7,94	**1,47** 8,05/5,48
H_2SO_4(pH 1,4) t = 80±0,5 °C	6,6	3,1	**2,10** 17,97/8,56	**1,97** 16,96/8,61	**2,22** 19,76/8,90	**1,57** 17,94/11,43	**2,04** 17,00/8,33

Наступним етапом було вивчення кількісного та якісного складу та відмінностей специфічного мікробного ценозу зразків відвалів, яке формується залежно від часу їх зберігання (табл. 4). Аналіз даних свідчить про наявність

Таблиця 4

Чисельність бактерій (КУО/мл) в живильних середовищах при культивуванні на відвалах ЦЗФ (через 5 діб)

Table 4

The number of bacteria (CFU/ml) in the media under cultivation on the CCF waste dumps (after five days)

Субстрат	Гетеротрофні мікроорганізми			Міцеліальні гриби	Хемолітотрофні бактерії							
					Ацидофільні							Нейтрофільні
					Мезофільні				Помірно термофільні			
	Горбенко		А-27	Чапека	9К			882	9К*		150а	Бейеринка
	Споро твірні	Неспоро твірні	Споро твірні		$Na_2S_2O_3$	S^0	Fe^{+2}	Fe^{+2}	Fe^{+2}	$Na_2S_2O_3$	$Na_2S_2O_3$	$Na_2S_2O_3$
Чорний	2,5±0,3 x10^6	4,2±0,3 x10^6	9,3±0,3 x10^3	1,2±0,1 x10^2	5,3±0,3 x10^4	1,6±0,3 x10^3	6,4±0,6 x10^5	1,7±0,3 x10^3	8,9±0,6 x10^7	7,4±0,4 x10^8	1,6±0,3 x10^4	1,4±0,3 x10^2
Червоний	3,9±0,3 x10^6	1,2±0,3 x10^7	3,2±0,3 x10^4	4,2±0,3 x10^3	3,3±0,5 x10^6	2,8±0,2 x10^6	8,4±0,6 x10^7	3,5±0,3 x10^5	1,2±0,6 x10^9	9,4±0,5 x10^9	3,8±0,3 x10^4	2,0±0,24 x10^4

у відвалах широкого спектру мікроорганізмів – представників різних фізіологічних груп, незалежно від часу зберігання. Виявлені представники гетеротрофних бактерій (споротвірні та неспоротвірні), у тому числі «силікатних»; встановлено присутність ацидофільних хемолітотрофних мезофільних та помірно термофільних бактерій. Серед мезофільних виявлено бактерії двох груп: перша здатна окиснювати сірку, її сполуки (тіосульфат, тіосечовину та ін..) і двовалентне залізо; друга використовує як джерело енергії тільки сполуки сірки (тіосульфат, тіосечовину та ін.). Це дозволяє припустити наявність у мікробних ценозах представників не тільки «універсальних» бактерій *Acidithiobacillus ferrooxidas,* а і *Acidithiobacillus thiooxidans,* які, згідно з літературними даними, зустрічаються у природних сульфідних рудах та промислових концентратах значно рідше [9].

Серед мезофільних бактерій встановлена присутність у породних відвалах різного терміну зберігання залізоокиснювальних бактерій, що належать до представників *Leptospirillum,* а також нейтрофільних тіонових бактерій, що зростають на живильному середовищі Бейєрінка та використовують як джерело енергії сірку та тіосульфат. Це дозволяє віднести їх до представників роду *Thiobacillus*.

Крім мезофільних, у породних відвалах незалежно від часу зберігання виявлені представники помірно термофільних бактерій: на середовищі 9К* – роду *Sulfobacillus,* на середовищі 150а – *роду Acidithiobacillus та Sulfobacillus.*

Незважаючи на відсутність відмінностей у якісному складі мікробіоценозу субстратів, кількісний склад представників виявлених груп мікрооранізмов мікробіоти істотно відрізняється: кількість мікроорганізмів у червоних породних відвалах, які тривалий час накопичуються та зберігаються на площадках, значно, на 2–3 порядки більша, ніж у чорних. Ця різниця найбільш помітна для основних груп ацидофільних хемолітотрофних бактерій, як мезофільних, так і помірно термофільних. Отримані результати повністю узгоджуються з наведеними вище.

Таким чином, проведені дослідження показали, що в процесі накопичення та зберігання відвалів збагачення на ЦЗФ «Червоноградська» в їх складі відбуваються значні фізико-хімічні та мікробіологічні зміни, які повинні враховуватися при виборі умов утилізації цих техногенних субстратів біотехнологічними методами з використанням активності представників власної мікробіоти. Встановлено, що у червоних відвалах при тривалому зберіганні за рахунок вивітрювання складових компонентів відбувається концентрування за деякими породоутворювальними елементами і елементами-домішками. Під впливом вологого повітря відбувається насичення незв'язаною водою і окиснення йонів металів сировини до вищого ступеню з утворенням більш стійких (порівняно з чорним) рівноважних структур. Вплив власної мікробіоти субстратів відвалів на рівновагу і стійкість досліджуваних систем є помітним і також залежить від термінів зберігання відвалів. Встановлений якісний склад мікробіоценозу субстратів не залежить від часу зберігання, оскільки формується в процесі утворення та при збагаченні вугілля. Проте кількісна перевага

в червоних відвалах представників різних груп мікроорганізмів власної мікробіоти є наслідком змін, які відбуваються при зберіганні у цих субстратах під впливом зовнішніх чинників.

И.А. Блайда, Т.В. Васильева, В.Ф. Хитрич, Н.Ю. Васильева, О.И. Джамбек, А.А. Джамбек

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38(048) 746 51 02,
e-mail: iblayda@ukr.net

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОРОДНЫХ ОТВАЛОВ ОБОГАЩЕНИЯ УГЛЯ

Реферат

Цель. *Изучение физико-химических и микробиологических особенностей техногенных субстратов в зависимости от срока их хранения.* ***Методы.*** *Атомно-эмиссионная и атомно-абсорбционная спектроскопия, потенциометрический метод и авторская запатентованная электрохимическая ячейка, стандартный микробиологический метод накопительных культур.* ***Результаты.*** *Установлено, что в отвалах при длительном хранении происходит концентрирование по основным составляющим и окисление ионов металлов сырья до высшей степени с образованием более устойчивых равновесных структур. Показано влияние собственной микробиоты субстратов отвалов на их устойчивость в процессе переработки. Получены и количественно оценены накопительные культуры микроорганизмов различных физиологических групп, формирующих микробиоценоз субстратов. Установлено количественное преобладание представителей основных групп ацидофильных хемолитотрофных бактерий, как мезофильных, так и умеренно термофильных в собственной микробиоте отвалов с длительным сроком хранения, что приводит к более выраженному влиянию биоценоза на физико-химические характеристики этих субстратов.* ***Выводы.*** *В процессе накопления и хранения отвалов в их составе происходят значительные физико-химические и микробиологические изменения, которые должны учитываться при выборе условий утилизации этих техногенных субстратов биотехнологическими методами с использованием активности представителей собственной микробиоты.*

Ключевые слова: отвалы, микробиота, выщелачивание, ацидофильные хемолитотрофные бактерии.

I.A. Blayda, T.V. Vasyleva, V.F. Chitrich, N.Yu. Vasyleva, O.I. Dgambek, O.A. Dgambek

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska St., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (048) 746 51 02, e-mail: iblayda@ukr.net

PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE WASTE DUMPS AFTER COAL ENRICHMENT

Summary

Aim. *The physical-chemical and microbiological characteristics of technogenic substrates depending on the duration of their storage have been studied.* ***Methods.*** *Atomic emission and atomic absorption spectroscopy, potentiometric method and the author's patented electrochemical cell, standard microbiological method of cumulative cultures.* ***Results.*** *It was established, that during long storage of waste dumps there occurs the components concentration and oxidation of metal ions, that were found in the waste dumps, to the highest degree of oxidation and were formed more stable equilibrium structures. The effect of indigenous microbiota of waste dumps to increase their resistance to the processing has been shown. As it has been shown the indigenous microbiota of waste dumps are facilitated of increase their resistance to the recycling. The cumulative culture of microorganisms of different physiological groups forming microbiocenosis of waste dumps were obtained and quantified. The quantitative predominance of representatives of major groups of chemolithotrophic acidophilus bacteria (both mesophilic and moderately thermophilic) of indigenous microbiota from waste dumps with extended storage period, has been established. That, in turn, leads to a more pronounced effect of microbiota on the physicochemical characteristics of these waste dumps.* ***Conclusion.*** *The physical, chemical and microbiological changes are significant in storage dumps composition in the process of their accumulation. This should be taken into account in selecting the conditions of utilization of technogenic substrates by biotechnological methods using active members of their own microbiota.*

Key words: waste dumps, microbiota, bioleaching, chemolithotrophic acidophilus bacteria.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Blayda I., Vasyleva T., Slyusarenko L., Abisheva Z., Ivanytsia V.* The germanium extraction from industrial wastes by microbiological methods//XXVI International Mineral Processing Congress (IMPC 2012), New Delhi, India, September 24-28, 2012. – P. 550–558.

2. *Bogdanova T.I., Tsaplina I.A., Kondrat'eva T.F.* Sulfobacillus thermotolerans sp. nov., a thermotolerant, chemolitothrophic bacterium //International journal systematicic and evolutionary microbiology. – 2000. – 56. – P. 1039–1042.

3. *Zeng Wei-min, Wu Chang-bin, Zhang Ru-bing, Hu Pei-lei, Qiu Guan-zhou, Gu Guo-hua, Zhou Hong-bo.* Isolation and identification of moderately thermophilic acidophilic iron-oxidizing bacterium and its bioleaching characterization //Trans. Nonferrous Met. Soc. China. – 2009. – V. 19. – P. 222–227.

4. *Блайда. И.А., Васильева Т.В., Баранов В.И., Слюсаренко Л.И., Баклан В.Ю.* Возможности бактериального и химического выщелачивания отходов углеобо-

гащения с целью извлечения германия и галлия. //Известия Вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2013. – № 1(4). – С. 54–60.

5. *Блайда И.А*. Состав и активность бактериального сообщества отходов углеобогащения//Biotechnologia Acta. – 2014. – Vol. 7 (5). – P. 94–100. doi:10.15407/biotech7.05.094.

6. *Блайда И.А., Васильева Т.И., Баранов В.И.* Использование биогидрометаллургических технологий в решении проблем утилизации техногенных отходов с получением ценных металлов // Комплексное использование минерального сырья. – 2015. – № 3. – С. 75–82.

7. *Блайда І.А., Васильева Т.В., Баранов В.И., Семенов К.И., Слюсаренко Л.И., Барба И.Н.* Свойства новых штаммов хемолитотрофных бактерий, выделенных из техногенных субстратов/Properties of chemolithotrophic bacteria new strains isolated from industrial substrates // Biotechnologia Acta. – 2015. – Vol. 8 (6). – P. 56–62. doi: 10.15407/biotech8.06.056.

8. *Каравайко Г.И.* Практическое руководство по биогеотехнологии металлов. – М., АНСССР, 1989. – 371 с.

9. *Кузякина Т.И., Хайнасова Т.С., Левенец О.О.* Биотехнология извлечения металлов из сульфидных руд//Вестник наук о Земле. – 2008. – Т. 60, Вып. 12. – С. 76–85.

10. *Методы* общей бактериологии. Т. 2. *М.: Мир*, 1984. – 265 с.

11. *Современная* микробиология. Прокариоты. Ленгелер Й., Древс Г.И., Шлегель Г. (ред.). Т. 2. М.: Мир, 2005. – 496 с.

12. *Усова Т.Ю., Линдер Т.П.* Конъюнктура мирового рынка редких металлов. – В кн. «Рідкісні метали України – погляд у майбутнє». – Київ. – 2001. – С. 102–103.

13. *Хавезов И*., *Цалев Д.* Атомно-абсорбционный анализ. – Л.: Химия, 1983. – 144 с.

14. *Химия* и технология редких и рассеянных элементов/Под ред. К.А. Большакова – М.: Высшая школа, 1976. – Т. 3. – 368 с.

15. *Пат.* на винахід № 102926 UA. Спосіб вилучення рідкісних металів з відходів вугільної промисловості//Блайда І.А., Васильєва Т.В., Слюсаренко Л.І., Хитрич В.Ф., Барба І.М., Іваниця В.О., Баранов В.І. Бюл. № 16. Заявл. 20.03.2012. Опубл. 27.08.2013.

16. *Пат.* 104788 UA. Спосіб виготовлення двокамерної триелектродної електрохімічної комірки // Джамбек О.А., Джамбек О.І., Блайда І.А., Іваниця В.О., Васильєва Т.В. Бюл. № 4. Заявл. 05.05.2015. Опубл. 25.02.2016.

REFERENCE

1. Blayda I., Vasyleva T., Slyusarenko L., Abisheva Z., Ivanytsia V. The germanium extraction from industrial wastes by microbiological methods. In: XXVI International Mineral Processing Congress (IMPC 2012), New Delhi, India. September 24-28, 2012:550-558.

2. Bogdanova T.I., Tsaplina I.A., Kondrat'eva T.F. Sulfobacillus thermotolerans sp. nov., a thermotolerant, chemolitothrophic bacterium. International journal systematicic and evolutionary microbiology. 2000; (56):1039 – 1042.

3. Zeng Wei-min, Wu Chang-bin, Zhang Ru-bing, Hu Pei-lei, Qiu Guan-zhou, Gu Guo-hua, Zhou Hong-bo. Isolation and identification of moderately thermophilic acidophilic iron-oxidizing bacterium and its bioleaching characterization. Trans. Nonferrous Met. Soc. China. 2009;(19):222 – 227.

4. Blayda I.A., Vasyleva T.V., Baranov V.I., Slyusarenko L.I., Baklan V.Yu. Opportunities bacterial and chemical leaching of coal refuse with aim to germanium and gallium extraction. Izvestiya Vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya.2013;(4):54-60.

5. Blayda I.A. The study of composition and activity of bacterial community of coal tailing. Biotechnologia Acta.2014;(5):94-100. doi:10.15407/biotech7.05.094.

6. Blayda I.A., Vasileva T.V., Baranov V.I.. The use of bio-hydrometallurgical technologies in solving problems utilization of manmade waste and receiving from them valuable metals. Kompleksnoe ispolzovanie mineralnogo syirya.2015;(3):75-82.

7. Blayda I. A., Vasileva T.V., Baranov V.I., Semenov K.I., Slyusarenko L.I., Barba I.N. Properties of chemolithotrophic bacteria new strains isolated from industrial substrates. Biotechnologia Acta.2015;(6):56-62. doi: 10.15407/biotech8.06.056.

8. Karavayko G.I. Prakticheskoe rukovodstvo po biogeotekhnologii metallov. Moscow: Academy science of the USSR, 1989. 371 p.

9. Kuziakina T.I., Khainasova T.S., Levenetc O.O. Biotechnology extraction of metals from sulphide ores. Vestnik nauk o Zemle.2008;(12):76-85.

10. Methods for General Bacteriology. V. 2. Moskva: Mir, 1984. 265 p.

11. Sovremennaia mikrobiologiia. Prokarioty (Modern microbiology. Prokaryotes). Lengeler I., Drevs G. I., Shlegel G. (eds.). M.: Mir, 2005.V.2: 496 p.

12. Usova T.Yu., Linder T.P. The conjuncture of the world market of rare metals. In: Redkie metally Ukrainy – vzglyad v budushchee. Kiev, 2001:102–103.

13. Khavezov I., Tsalev D. Atomic absorption analysis. Leningrad: Khimiya, 1983. 144 p.

14. Khimiya i tekhnologiya redkikh i rasseyannykh ehlementov (Chemistry and technology of rare and trace elements). K.A. Bol'shakov (ed.). Moscow: Vysshaya shkola, 1976.V.3:368 p.

15. A.s. 102926 UA, MBI C 22 B 3/18. The method of extracting rare metals from waste coal industry. Blayda I.A., Vasileva T.V., Slyusarenko L.I., Khitrich V.F., Barba I.M., Ivanitcia V.O., Baranov V.I. (UA). – zayavl. 20.03.2012; opubl. 27.08.2013, Byul. N 16.

16. A.s. 104788 UA, MBI H 01M 4/00. Two-cell production method with three electrode electrochemical cell. Dzhambek O.A., Dzhambek O.I., Blayda I.A., Ivanitcia V.O., Vasileva T.V. (UA). – zayavl. 05.05.2015; opubl. 25.02.2016, Byul. N 4.

Стаття надійшла до редакції 30.05.2016 р.

Шановні автори!

До правил оформлення рукописів статей внесено зміни, які будуть діяти з 2016 року. До розгляду редколегія буде приймати рукописи оформлені належним чином за вимогами журналу.

Внесення змін до оформлення списку використаних джерел продиктовано вимогами міжнародних наукометричних баз, для ідентифікації авторів, визначення індекса цитування авторів.

«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 не більше 15 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 додаються реферати українською, російською та англійською мовами.

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

- реферат має бути інформативним (не містити зайвих слів);
- структурованим, тобто містити розділи: мета; методи, що використані в роботи 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 англомовних медикобіологічних журналах, уникати використання термінів, які є прямою українською/російською калькою;
– компактним (200-250 слів).
• ключові слова (не більше 5-ти) розміщуються з абзацу після реферату.

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

• Розділ «Матеріали і методи»:
– Методи дослідження та схеми експерименту мають бути представлені так, щоб їх можна було відтворити.
– Для використаних реактивів та матеріалів вказати назву кампанії та країни-виробника.
– Одиниці вимірювання вказати в системі СІ.
– Концентрацію розчинів представляти в М, мМ, мкМ (молярна концентрація).
– Молекулярну масу (Мм) – Да (дальтони) або кДа.
– При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.
– Активність ферментів виражають в 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 ммолях/хв на 1 мг протеїну або в од.акт/мг, кат/кг.
– Вказати умови проведення ферментативної реакції (температура, pH, 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 шрифта – 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 посилань 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 phtalate 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

Лопатина Н.В., *Терентьев А.Н., Наталич Л.А., Янгулов Ш.У.* Оптимизация питательной среды для культивирования вакцинного штамма чумного микроба с применением метода математического планирования эксперимента / Редкол. «Микробиол. журн.» – К., 1991. – 7 с. – Деп. в ВИНИТИ 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 шрифта для англомовного варианту списка 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, Lukyanenko 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 литератури 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.

Верстка В. Г. Вітвицька

Підписано до друку 21.06.2016 р. Формат 70х100/16.
Ум.-друк. арк. 7,9. Тираж 100 пр.
Зам. № 1424.
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