

УДК 597.8

**С.Я. Комплікевич¹, О.Д. Масловська¹, Н.П. Менів^{1,2},
Н.М. Кулішко¹, О.Р. Іщак¹, С.О. Гнатуш¹**¹Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,
тел.: +38(032) 239 40 53, e-mail: svtlana.hnatush@lnu.edu.ua²Львівська медична академія імені Андрея Крупинського,
вул. Дорошенка, 70, Львів, 79000, Україна

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

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

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



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

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

Матеріали і методи

Нагромаджувальну культуру сірковідновлювальних бактерій отримували із зразків породного відвалу шахти «Надія» (вершина, незадернована червона порода). Наважку породи 1 г вносили у 10 мл стерильного фізіологічного розчину і робили розведення. Суспензію висівали на чашки Петрі з середовищем Постгейта С, в яке замість SO_4^{2-} вносили еквімолярну кількість S^0 (32 мМ) (KH_2PO_4 – 0,5 г; NH_4Cl – 1,0 г; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,06 г; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,055 г; $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ – 6,0 г; дріжджовий екстракт – 1,0 г; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ – 0,3 г; дистильована вода – до 1000 мл; рН 7,0–7,5) і вирощували в мікроанаеростаті із двома газогенераторними пакетами GENbox anaer (bioMérieux, Франція) за температури +28 °С упродовж 3–14 діб. Для підтвердження умов анаеробіозу використовували індикатор анаеробних умов Anaer Indicator (bioMérieux, Франція). Виділення ізолятів сірковідновлювальних бактерій із нагромаджувальних культур проводили за інтенсивністю забарвлення колоній унаслідок утвореного ними FeS за росту в середовищі Постгейта С із сіркою. Чисті культури отримували в результаті багаторазових пересівів окремих колоній. Чи-



стоту культури контролювали з використанням світлового мікроскопа (Carl Zeiss Axio Lab.A1, $\times 1000$). Потім виділений ізолят культивували на триптон-соєвому агарі (Merck, USA) за температури $+28\text{ }^\circ\text{C}$ упродовж 5 діб. Ідентифікацію ізоляту проводили, використовуючи морфологічні, фізіолого-біохімічні властивості та результати секвенування гена 16S рРНК. Форму та розмір клітин, тип клітинної стінки встановлювали за використання методів світлової мікроскопії (бінокулярний мікроскоп Carl Zeiss Axio Lab.A1, $\times 1000$), рухомість – за методом Шукевича. Каталазну активність виявляли за появою бульбашок O_2 після нанесення на колонію ізоляту кількох крапель 10% H_2O_2 [1].

Оксидазну активність виявляли із використанням смужок, насичених N,N-диметил-п-фенілендіамін оксалату та α -нафтолу (Millipore, USA). Відношення до кисню визначали за характером росту у напіврідкому тіогліколевому середовищі. Здатність використовувати цитрат як єдине джерело карбону визначали на цитратному агарі Крістенсена, а ферментувати глюкозу, лактозу, утворювати H_2S досліджували за характером росту на середовищі Кліглера (Merck, USA). Для дослідження здатності бактерій метаболізувати різні джерела карбону використовували тест-систему ID 32 GN (bioMérieux, France). Здатність бактерій ферментувати різні джерела карбону виявляли упродовж росту у середовищах Гісса з арабінозою, глюкозою, дульцитом, інозитом, ксилозою, лактозою, мальтозою, манітом, манозою, рамнозою, сахарозою, сорбітом. Здатність відновлювати нітрати визначали із застосуванням реактиву Гріса-Айлосвая (Merck, USA) після росту на нітратному бульйоні, фіксувати молекулярний азот – за ростом на середовищі Ешбі [1]. Для дослідження здатності до нітрифікації бактерії вирощували на середовищі Виноградського для I та II фази нітрифікації [1]. Амілазну активність оцінювали за ростом на крохмально-аміачному агарі та утворенням видимих зон гідролізу крохмалю після нанесення розчину Люголя на колонії [1]. Ліпазну активність оцінювали за здатністю ізоляту утворювати кристали кальцієвих солей жирних кислот навколо колоній після росту на середовищі з твіном-20 [1]. Для дослідження стійкості ізоляту до солей важких металів у середовище R2A (Merck, USA) вносили $\text{CdCl}_2 \times 2,5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ та $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ для отримання концентрацій 2–200 мкМ кадмію (II), 1–25 мМ мангану (II), 1–25 мМ феруму (II), 0,05–1 мМ кобальту (II), 0,05–1 мМ купрум (II), 0,01–2 мМ хрому (VI).

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



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

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

Результати дослідження та їх обговорення

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

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

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

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

За морфологічними (форма клітин, рухомість тощо) і фізіологічними ознаками, зокрема, оксидазною та каталазною активностями, здатністю рости аеробно чи анаеробно, використовувати цитрат як єдине джерело карбону, зброджувати глюкозу з утворенням кислоти, утворювати H₂S за росту на середовищі Клігlera, а також враховуючи дані філогенетичної реконструкції



Таблиця 1

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

Table 1

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

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

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



Таблиця 2

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

Table 2

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

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

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

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

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



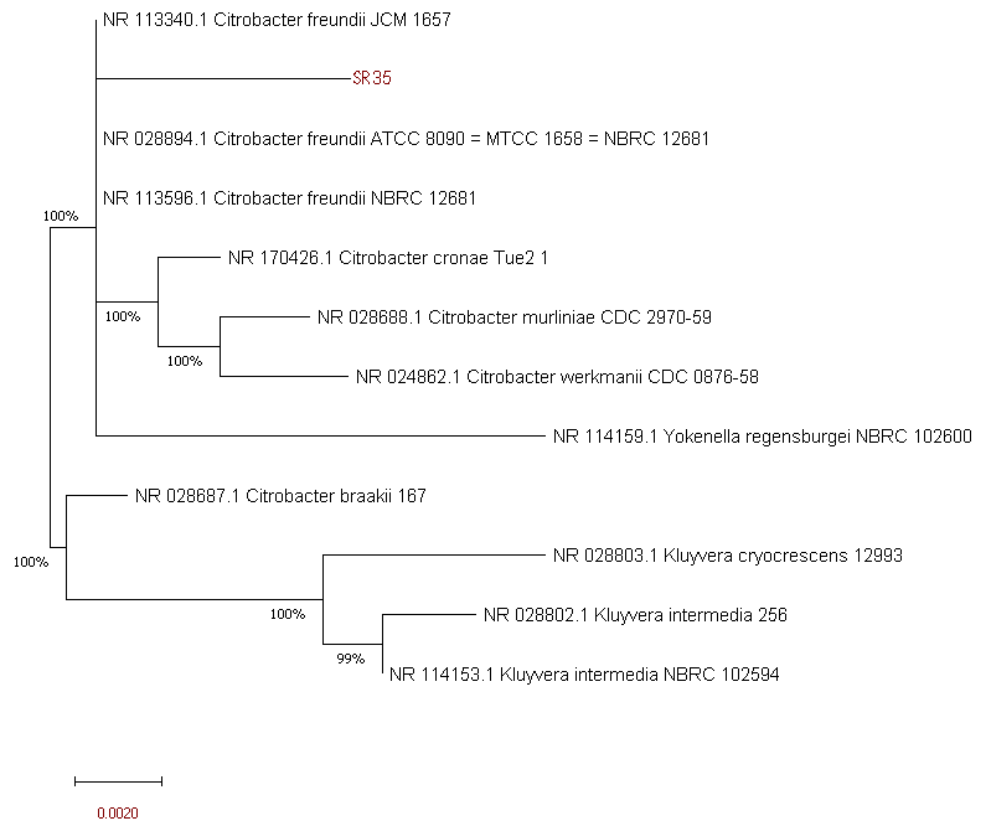


Рис. 1. Філогенетична реконструкція гена 16S рРНК ізоляту SR35 із найвищою логарифмічною правдоподібністю (-2415.12) методом максимальної вірогідності за моделлю Hasegawa-Kishino-Yano із 1000 бутстрєп реплікацій. Біля гілок подано значення відсотку дерев, у яких ці послідовності розміщені поряд

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

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



Таблиця 3

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

Table 3

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

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

Примітка. «+» – є ріст, «–» – немає росту.

Notes: «+» – growth; «–» – no growth.

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

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

**S.Y. Komplikevych¹, O.D. Maslovska¹, N.P. Meniv^{1,2},
N.M. Kulishko¹, O.R. Ishchak¹, S.O. Hnatush¹**

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

²Andrei Krupynskiy Lviv Medical Academy, Doroshenko Str., 70, Lviv, 79000, Ukraine

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

Summary

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



of reducing sulfur and sulfate ions, were isolated from the waste dump of the Nadiya coal mine, Chervonograd Mining and Industrial district (Lviv region, Ukraine). **The work aimed** to identify and study morphological, physical and chemical properties (cell shape, size, Gram staining, sporulation, motility, oxygen requirements, ability to form H₂S, utilization of carbon sources, catalase activity, oxidase activity) of isolate SR35. **Methods.** We used standard microbiological and biochemical research methods (microbial culture, microscopy methods, determination of amylase, lipase activity). Chromosomal DNA was isolated by the method of soft lysis. The 16S rRNA gene was amplified using universal primers 27F and 1492R. It was sequenced by the Sanger method. Phylogenetic reconstruction was performed using the MEGA X program. Identification of isolates was carried out based on both the sequence of the 16S rRNA gene and physiological and biochemical properties. **Results.** The studied bacteria are rods (0.5–0.8×1.5–2.0 μm), which form chains and are capable of reducing nitrate and sulfate ions and assimilating several carbon sources. Glucose, lactose, mannose, mannitol, and inositol are fermented with the formation of acid. Motile. Catalase positive, oxidase negative. Form H₂S during growth in Kligler's medium. According to the results of pairwise alignment of the isolate's 16S rRNA gene sequence, the highest percentage of identity with representatives of the genus *Citrobacter* was established (99.23–99.86% identity, coverage 98%) and it was confirmed by phylogenetic reconstruction. *Citrobacter* sp. SR35 is resistant to 2 μM cadmium (II), 5 mM iron (II), 0.25 mM cobalt (II), 10 mM manganese (II), 0.5 mM copper (II), and 0.1 mM chromium (VI). **Conclusions.** According to the results of sequencing of the 16S rRNA (accession number GenBank OP279754) gene, and physiological, and biochemical characteristics (oxidase, catalase, metabolism of carbon sources, production of H₂S, etc.), it was established that isolate SR35 belongs to the genus *Citrobacter*.

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

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



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



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

REFERENCES

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



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

Стаття надійшла до редакції 15.08.2022 р.

