

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

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

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

№ 2(46)  
2019

Одеса  
ОНУ  
2019

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

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

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

**Науковий редактор випуску В. О. Іваниця**

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

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

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

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

© Одеський національний університет  
імені І. І. Мечникова, 2019

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

**EDITOR-IN-CHIEF**

V. O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

**CO-EDITOR-IN-CHIEF**

T. O. Filipova (Odesa, Ukraine)

**EXECUTIVE SECRETARY**

T. V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

**EDITORIAL BOARD MEMBERS**

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

**Scientific editor V. O. Ivanytsia**

*Accepted for publishing articles are reviewed*

Approved for publishing by Academic Council  
of Odesa National Mechnykov University

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

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

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

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

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

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

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

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

© Odesa National Mechnykov  
University, 2019

## ЗМІСТ

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

<b>В. О. Стецька, Ю. В. Голота, С. Ю. Гончар, М. Ю. Корбуш, Т. В. Довбинчук, Т. М. Сергійчук, Г. М. Толстанова</b> ПОРІВНЯННЯ ДОВГОТРИВАЛОГО ЕФЕКТУ ДВОХ МОДЕЛЕЙ ДИСБІОЗУ У ЩУРІВ ЛІНІЇ WISTAR .....	6
<b>Т. В. Гудзенко, І. П. Конуп, О. В. Волювач, М. М. Чабан, О. Г. Горшкова, Т. О. Беляєва, М. Б. Галкін</b> ДЕСТРУКЦІЯ ФЕНОЛУ ПРИ ФОРМУВАННІ ПОЛІВИДОВОЇ БІОПЛІВКИ НА ПРИРОДНИХ І СИНТЕТИЧНИХ НОСІЯХ У БІОФІЛЬТРИ .....	16
<b>І. В. Акуленко, М. Ю. Корбуш, В. О. Стецька, Т. М. Сергійчук, Г. М. Толстанова, Н. М. Степанова</b> ВПЛИВ АНТИБІОТИКОТЕРАПІЇ НА ЗАГАЛЬНУ КІЛЬКІСТЬ ОКСАЛАТДЕГРАДУВАЛЬНОЇ МІКРОБІОТИ У КИШКОВОМУ ТРАКТІ ЩУРІВ .....	27
<b>І. В. Страшнова, Г. В. Ямборко, Н. Ю. Васильєва</b> СТІЙКІСТЬ ШТАМІВ ЛАКТОБАЦИЛ, ВИДІЛЕНИХ З РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ, ДО ДЕЯКИХ АГРЕСИВНИХ ЧИННИКІВ ТРАВНОГО ТРАКТУ .....	38
<b>Д. Р. Абдуліна, Ж. П. Коптєва, Г. Є. Коптєва, М. Я. Вортман</b> ВПЛИВ ПОЛІМЕРНИХ І ГУМОТЕХНІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ НА ВУГЛЕВОДЕНЬОКИСНЮВАЛЬНІ БАКТЕРІЇ .....	51
<b>Т. А. Круподьорова, В. Ю. Барштейн</b> АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ МАКРОМІЦЕТІВ ПРОТИ <i>MUCOR SP.</i> <i>IFBG 139</i> .....	65
<b>І. Д. Жунько, Г. І. Жумінська</b> СКРИНІНГ ПРОДУЦЕНТІВ СИДЕРОФОРІВ СЕРЕД ШТАМІВ <i>PANTOEA</i> <i>AGGLOMERANS</i> .....	76
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ .....	84

# CONTENTS

## EXPERIMENTAL WORKS

<b>V. O. Stetska, Yu. V. Holota, S. Yu. Gonchar, M. Yu. Korbush, T. V. Dovbynychuk, T. M. Serhiychuk, G. M. Tolstanova</b> COMPARISON OF LONG-TERM EFFECT OF TWO DYSBIOSIS MODELS IN WISTAR RATS .....	6
<b>T. V. Gudzenko, I. P. Konup, O. V. Voliuvach, M. M. Chaban, O. G. Gorshkova, T. O. Belyaeva, M. B. Galkin</b> DESTRUCTION OF PHENOL AT THE FORMATION OF POLYVIDOUS BIOFILM ON NATURAL AND SYNTHETIC CARRIERS IN THE BIOFILTER .....	16
<b>I. V. Akulenko, M. Y. Korbush, V. O. Stetska, T. M. Serhiychuk, G. M. Tolstanova, N. M. Stepanova</b> EFFECT OF ANTIBIOTICOTHERAPY ON THE TOTAL AMOUNT OF OXALATE-DEGREADING BACTERIA IN THE RATS INTESTINAL TRACT .....	27
<b>I. V. Strashnova, G. V. Yamborko, N. Yu. Vasylieva</b> RESISTANCE OF LACTOBACILLI STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT SOURCE TO SOME AGGRESSIVE FACTORS OF THE DIGITAL TRACT .....	38
<b>D. R. Abdulina, Zh. P. Kopteva, A. E. Kopteva, M. Ya. Vortman</b> INFLUENCE OF POLYMERIC AND RUBBER MATERIALS ON HYDROCARBON-OXIDIZING BACTERIA .....	51
<b>T. A. Krupodorova, V. Yu. Barshteyn</b> ANTAGONISTIC ACTIVITY OF MACROMYCETES AGAINST <i>MUCOR</i> SP IFBG 139 .....	65
<b>I. D. Zhunko, G. I. Zhuminska</b> SCREENING OF SIDEROPHORE PRODUCERS AMONG <i>PANTOEA</i> <i>AGGLOMERANS</i> STRAINS .....	76
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS .....	84

UDC 616.34-002-084-08

**V. O. Stetska, Yu. V. Holota, S. Yu. Gonchar, M. Yu. Korbush,  
T. V. Dovbynchuk, T. M. Serhiychuk, G. M. Tolstanova**Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine"  
of Taras Shevchenko National University, 64/13, Volodymyrska Street, Kyiv, Ukraine,  
01601, tel.: +38 (044) 521 35 98, email: gannatolstanova@knu.ua**COMPARISON OF LONG-TERM EFFECT OF TWO  
DYSBIOSIS MODELS IN WISTAR RATS**

**Aim.** To compare the changes of intestinal microbial composition of two models of dysbiosis induced by ceftriaxone (Cf) or the mix of ampicillin (Amp) and metronidazole (Met). **Methods.** The object of the study was the changes of fecal and mucosa-associated microbiota of colon and small intestine of Wistar male rats ( $m=170-200g$ ,  $n=19$ ). Cf was injected once a day for 14 days at a dose of 300 mg/kg i.m. The mix of Amp (75 mg/kg) and Met (50 mg/kg) was injected once a day for 3 days per os. Animals were removed from the experiment in 1 day and 56<sup>th</sup> days after treatment withdrawal. The microbiological analysis of the fecal (CFU/g) and mucosa-associated (CFU/cm<sup>2</sup>) biotopes of the rats were carried out bacteriologically by sowing the dilutions into the selective diagnostic media for Bifidobacterium, Lactobacillus, Clostridium, E. coli, opportunistic enterobacteria, Staphylococcus and hemolytic bacteria. **Results.** It was shown that the changes of fecal microbiota after Cf withdrawal progressed with time and continued until the 56<sup>th</sup> day of observation. Cf administration induced 2 folds decrease the number of colon mucosa-associated anaerobic bacteria Bifidobacterium and Lactobacillus. Moreover, there was over growth of bacteria in the small intestine in 56 days. The mix of Amp/Met induced dysbiosis on the 1st day after the mix withdrawal. The normalization of the colon microbial composition was observed in 56 days.. The mix of Amp/Met increased only quantity of opportunistic enterobacteria and lactose-positive E.coli in mucosa-associated microbiota of small intestine in 56 days after the mix withdrawal. **Conclusions.** Injecting of the mix of Amp/Met to rats is more adequate model for modelling acute dysbiosis. Cf use induced long-term profound changes in microbiota composition and might be suitable to model chronic dysbiosis.

*Key words:* microbiota, antibiotics, long-term effect, dysbiosis.

There is till to 3–30% of the patients with adverse effects during or after antibiotics treatment. The most common are allergic reactions and the digestive disorders. Dysfunctions of the gastrointestinal tract are especially often observed in children and elderly [2].

The antibiotic-associated dysbiosis was found in 5–30% of the patients, during or immediately after antibiotic therapy [8]. The classic example of the consequence of dysbiosis is antibiotic-associated diarrhea occurs in approximately 9–43% of the patients, treated with cephalosporins of the II and III generations,

© В. О. Стецька, Ю. В. Голота, С. Ю. Гончар, М. Ю. Корбуш, Т. В. Довбинчук, Т. М. Сергійчук,  
Г. М. Толстанова, 2019



20–30% – clindamycin, 23–71% – amoxicillin/clavulanate, 11% of those, treated with other broad spectrum penicillium and 8–16% – macrolides [9].

Antibiotic treatment often reduced metabolic activity of human microbiome and changed the spectrum of microorganisms. These changes cannot even revert to the initial state in several weeks [10] or even in years after antibiotic therapy [7]. Intravenous use of antibiotic ciprofloxacin increased the numbers of intestinal Gram-positive aerobic bacteria and orally use clindamycin induced the shift in microbial population at the genus level up to 12 months of the experiment. Vancomycin administration for 2 weeks orally altered the fecal microbiota structure observed even in 22 weeks [13].

It is important to note that the method and frequency of antibiotic use do not affect the risk of developing of antibiotic-associated complications. But there are no comprehensive comparative data on the long-term changes in the intestinal microbiota after different treatment regime and different antibacterial agents.

Thus, the aim of the study was to compare the changes of intestinal microbial composition of two models induced by ceftriaxone or the mix of ampicillin and metronidazole.

In present study the dysbiosis was induced by 14 days treatment with beta-lactam cephalosporin antibiotic ceftriaxone. Ceftriaxone is one of the most widely used antibiotic that inhibits the synthesis of bacterial cell wall and effects aerobic bacteria *Streptococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli* and anaerobic – *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.* [15]. This antibiotic is the first on the list according to Pharmacovigilance of Ukraine for 2011 extend of side effects on gastrointestinal tract [5].

Another used-model of dysbiosis is commonly accepted. Simultaneous injection of ampicillin with metronidazole for 3 days *per os* [4]. Antibiotic ampicillin is active against many aerobic Gram-positive ( $\alpha$ - and  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus*, *Staphylococcus spp.*) and Gram-negative bacteria (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*). Metronidazole is one of the main drugs for the treatment of anaerobic infections caused by *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Clostridium spp.* In medical practice this composition is used in obstetric practice in purulent inflammatory diseases where the antibiotics effected aerobic and anaerobic bacteria, obtained bactericidal effect and have a narrow spectrum of action to minimize the effect on the normobiota of intestine are required [6].

### Materials and methods

The experimental studies were carried out on Wistar male rats (170–200 g, n=19). All manipulation were carried out in accordance with the rules of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1986). All animals were kept under at standard conditions: temperature (22 °C), lighting (a cycle of 12h of light and 12h of darkness), humidity (30–35%) and diet (complete feed for laboratory animals K-12-4) and water *ad libitum*.

The object of the study was the changes of fecal and mucosa-associated microbiota of the colon and small intestine of rats.

The animals were divided into groups: I group (n=5) – control group (Cf)



was injected once a day for 14 days with 0.1 ml of saline intramuscularly (i.m.); II group (n=5) – the antibiotic Cf (PJSC "Kievmedpreparat", Ukraine) was injected once a day for 14 days, at a dose of 300 mg/kg (i.m.); III group (n=4) – control group (Amp/Met) was gavaged once a day for 3 days with 1 ml of saline *per os*; IV group (n=5) – the mix of Amp (Kyivmedpreparat, Ukraine) at a dose of 75 mg/kg and Met (Ph.C. "Zdorovya", Ukraine) at a dose of 50 mg/kg was gavaged once a day for 3 days [3]. The 1<sup>st</sup> day of treatment was the 1<sup>st</sup> day of experiment. The feces for the bacteriological analysis were collected in one and 56 days after antibiotic agents withdrawal. The animals were removed from the experiment in 56 days after treatment withdrawal by CO<sub>2</sub> inhalation followed by cervical dislocation. All the experiments were repeated twice.

During autopsy 1 cm<sup>2</sup> of colon (2 cm from the anus) and 1 cm<sup>2</sup> of small intestine (2 cm from the ileocecal valve) were collected for further bacteriological analysis of the mucosa-associated microbiota as it was described previously [12].

The quantitative and qualitative changes of the intestinal microbiota composition were identified on selective diagnostic media: Bifidobacterium Agar; MRS agar; Endo; Iron Sulphite Agar; Mannitol Salt Agar, Simmons Citrate Agar; Blood Agar Base (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) which were cooled to 45–50 °C and aseptically added 5% sterile sheep's blood. Inoculated media were incubated thermostatically at 37 °C for 24–48 h. Bergey's Manual of determinative Bacteriology was used for bacteria identification. Identification was carried out according to morphological and tinctorial characteristics (reaction to plasma coagulation, DNA activity, lysozyme and phosphatase production, sensitivity to novobicin – to differ *S. aureus*, *S. epidermidis* from *S. saprophyticus*; oxidase test, carbohydrate fermentation tests, Voges-Proskauer's reaction, mobility test, formation of hydrogen sulphide – to differ lactose-negative *E. coli* from opportunistic enterobacteria). The results are presented as M±m lg CFU/g and M±m lg CFU/cm<sup>2</sup>.

The statistical analysis of the results were performed using *Excel* and *STATISTICA* 8. We evaluated the differences between control and experimental groups using the Student t-test for independent samples. The P-value < 0.05 was considered statistically significant.

### Results and discussion

Treatment with ceftriaxone or the mix of Amp/Met did not significantly effect anaerobic saccharolytic bacteria (*Bifidobacterium* and *Lactobacillus*) isolated from the fecal biopsy (Table 1 and 2).

There were recorded the significant increase of the number of *Clostridium* genus representatives in 56 days after ceftriaxone withdrawal (table 1). Casey M. Theriot et al [15] have shown that treatment with antibiotic cefperazone changed the structure and functions of the intestinal microbiota in mice. These changes were accompanied by elevated levels of primary bile acids and carbohydrates that possibly contributed to the growth of *C. difficile* *in vitro* and *ex vivo* via 6-weeks after the antibiotic withdrawal. Today it is considered that antibiotics decrease resistance to *C. difficile* colonization that causes 10–30% antibiotic-associated dysbiosis [4].





Table 1

**Quantitative and qualitative (M±m lg CFU/g) changes of fecal microbiota after ceftriaxone withdrawal**

Group of microorganisms	Control n=5	The first day after Cf withdrawal n=5	The 56 <sup>th</sup> day after Cf withdrawal n=5
<i>Bifidobacterium spp.</i>	8.86 ± 0.24	8.77 ± 0.24	8.80 ± 0.15
<i>Lactobacillus spp.</i>	8.79 ± 0.16	8.18 ± 0.48	9.00 ± 0.21
<i>Clostridium spp.</i>	1.94 ± 0.06	1.74 ± 0.19	3.18 ± 0.48*
<i>Escherichia coli</i> lactose-positive	5.21 ± 0.27	0	7.04 ± 0.51*
<i>Escherichia coli</i> lactose-negative	1.72 ± 0.85	2.22 ± 0.92	4.12 ± 0.78*
Opportunistic enterobacteria	1.08 ± 0.44	4.10 ± 0.13*	6.02 ± 0.68*
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.41 ± 0.07	3.95 ± 0.67*	6.57 ± 0.48
<i>Staphylococcus spp.</i>	1.02 ± 0.08	4.68 ± 0.58*	6.69 ± 0.26*
Hemolytic bacteria	4.23 ± 0.23	7.63 ± 0.55*	6.34 ± 0.48*

\*P<0.05 compared to the control group

In our study, lactose-positive *E.coli* disappeared from fecal microbiota on the first day after ceftriaxone withdrawal and increased from 5.21±0.21 to 7.04±0.51 lg CFU/g in comparison with control value in 56 days. Lactose-negative *E. coli* and opportunistic enterobacteria increased gradually both straight after discontinuation of the antibiotic and in 56 days.

On the 1<sup>st</sup> day after the mix of ampicillin and metronidazole withdrawal there were observed the increasing of lactose-positive *E. coli* in fecal microbiota. In 56 days their growth rates were within the control values. Besides, on the first day after the mix withdrawal, there were observed increasing of the lactose-negative *E. coli* (from zero to 4.05±3.07 lg CFU/g) and opportunistic enterobacteria from 0.75±0.33 to 4.00±0.00 lg CFU/g. However, these changes were decreased twice vs. the first day after antibiotic agents withdrawal (table 2).

Usually the increase in the population level of *Escherichia* is associated with the decrease of anaerobic saccharolytic bacteria and insufficiency of immune protection. But in our study *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* were not changed that represents the first level of dysbiosis according to the classification of the Ministry of Health of Ukraine from 01.05.1996 No.4.

There were observed the increased growth of *Staphylococcus* genus and hemolytic bacteria in 8 weeks after ceftriaxone withdrawal.

Thus, the changes of fecal microbiota after ceftriaxone withdrawal progressed over time, but the mix of ampicillin and metronidazole caused changes on the first day after its withdrawal, they disappeared on their own in 8 weeks.

Zaharova et al [16] suppose that antibiotic-associated dysbiosis that develops in the first days after antibiotic using, more likely associated with the direct effect



of antibiotic on the intestinal microbiota with impaired synthesis of short-chain fatty acids (SCFA) and decreasing in fluid absorption in the lumen of the intestine and increasing its motility. The long-lasting changes of microbiota in the patients after antibiotic using is associated with greater likelihood of infection factors.

Table 2

**Quantitative and qualitative ( $M \pm m$  lg CFU/g) changes of fecal microbiota after Amp/Met withdrawal**

Group of microorganisms	Control n = 4	The first day after Amp/Met withdrawal n = 5	The 56 <sup>th</sup> day after Amp/Met withdrawal n=5
<i>Bifidobacterium spp.</i>	7.79±0.71	8.99±0.31	8.65±0.62
<i>Lactobacillus spp.</i>	7.75±0.43	8.75±0.06	7.92±0.44
<i>Clostridium spp.</i>	2.42±0.43	3.17±0.23	2.95±0.00
<i>Escherichia coli</i> lactose-positive	6.20±1.79	8.45±0.43*	5.99±0.72
<i>Escherichia coli</i> lactose-negative	0	4.05±3.07*	0
Opportunistic enterobacteria	0.75±0.33	4.00±0.00*	2.16±0.23
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.21±0.32	4.28±2.76	4.77±0.33
<i>Staphylococcus spp.</i>	2.3±1.74	4.39±2.91	4.26±0.20
Hemolytic bacteria	0	3.85±2.91*	2.77±1.96

\*P<0.05 compared to the control group

The mucosa-associated microbiota has better sustainability and represents overall homeostasis of bacteria. In our study the colon mucosa-associated microbiota showed the significant decreasing in the number of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* in 56 days after ceftriaxone withdrawal (table 3). The quantitative changes of anaerobic saccharolytic bacteria were not noted after the discontinuation of the mix of ampicillin and metronidazole use (table 4).

There was a significant increasing of *Clostridium spp.* in the mucosa-associated microbiota of colon in 56 days after ceftriaxone withdrawal. *Clostridium* were not found in the colon mucosa-associated microbiota after the mix of ampicillin and metronidazole.

Lactose-positive and lactose-negative *E. coli* disappeared in the colon mucosa-associated microbiota after ceftriaxone withdrawal, but the number of opportunistic enterobacteria increased to 10<sup>6</sup> CFU/cm<sup>2</sup>. It indicates the dumping of epithelial cells with bacteria in the cavity of the colon and an increasing number of these bacteria in fecal microbiota (table 1). After treatment with the mix of ampicillin and metronidazole, these bacteria were not found in the mucosa-associated intestinal microbiota (table 4).

The quantity of *S.aureus* in the colon mucosa-associated microbiota was also



Table 3

**Quantitative and qualitative (M±m lg CFU/cm<sup>2</sup>) changes of intestine mucosa-associated microbiota after ceftriaxone withdrawal**

Group of microorganisms	Microbiota of colon		Microbiota of small intestine	
	Control n=5	56 <sup>th</sup> day n=5	Control n=5	56 <sup>th</sup> day n=5
<i>Bifidobacterium spp.</i>	6.40±0.20	4.80±0.20*	5.00±0.50	7.20±0.20
<i>Lactobacillus spp.</i>	4.90±0.10	2.90±0.20*	5.00±0.20	6.00±0.10
<i>Clostridium spp.</i>	0.50±0.20	3.10±0.10*	0	0
<i>Escherichia coli</i> lactose-positive	2.00±0.10	0*	0.80±0.20	0*
<i>Escherichia coli</i> lactose-negative	1.60±0.20	0*	0.50±0.30	0.30±0.30
Opportunistic enterobacteria	0	5.00±0.00*	0	2.10±0.10*
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.50±0.20	3.10±0.10*	0	2.00±0.10*
<i>Staphylococcus spp.</i>	0.50±0.20	2.10±0.10	0	2.50±0.50*

\*P<0.05 compared to the control group

Table 4

**Quantitative and qualitative (M±m lg CFU/cm<sup>2</sup>) changes of intestine mucosa-associated microbiota after Amp/Met withdrawa**

Group of microorganisms	Microbiota of colon		Microbiota of small intestine	
	Control n=4	56 <sup>th</sup> day n=5	Control n=4	56 <sup>th</sup> day n=5
<i>Bifidobacterium spp.</i>	4.23±0.75	4.05±0.25	5.30±0.00	4.93±0.34
<i>Lactobacillus spp.</i>	3.87±0.42	3.90±0.14	5.17±0.78	5.42±0.08
<i>Clostridium spp.</i>	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> lactose-positive	2.00±1.83	0*	1.00±0.41	3.21±2.32*
<i>Escherichia coli</i> lactose-negative	1.10±0.56	0*	0	0
Opportunistic enterobacteria	0	0	0	1.11±0.56*
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.16±0.64	2.57±1.94	3.86±0.32	2.73±1.99
<i>Staphylococcus spp.</i>	2.33±1.70	2.83±2.01	3.95±0.62	3.83±0.62

\*P<0.05 compared to the control group

high after ceftriaxone withdrawal.

Thus, the changes after ceftriaxone were more pronounced in the colon mucosa-associated microbiota than in the fecal microbiota and may lead to serious damage of the macroorganism's homeostasis.

The study of small intestine mucosa-associated microbiota showed a significant increase in anaerobic saccharolytic bacteria in 56 days of ceftriaxone



withdrawal (table 3), at a time when there is a decrease in these microorganisms in the colon. It can be characterized as a syndrome of small intestinal bacterial overgrowth and the associated process of bile acids premature deconjugation [1].

The quantity of *Clostridium*, *E.coli* lactose-positive and lactose-negative of the small intestine mucosa-associated microbiota were within reference values. Only opportunistic enterobacteria and *Staphylococcus* genus increased to  $lg 2.10 \pm 0.10$  CFU/cm<sup>2</sup>.

There were observed the significant changes only in quantity of *E.coli* lactose-positive and opportunistic enterobacteria in the small intestine mucosa-associated microbiota after the mix of ampicillin and metronidazole withdrawal.

There was no particular difference in the changes of bacterial species of fecal microbiota after the antibiotics agents withdrawal. But there was the difference in the mucosa-associated microbiota, especially over growth in the small intestine after ceftriaxone using in 56 days.

The microbiota changes of the gastrointestinal tract after ceftriaxone using was stable and affects almost all studied groups of microorganisms. The microbiota changes after the mix of ampicillin and metronidazole withdrawal normalized up to 8 weeks of the experiment. Thus, for the modeling of acute dysbiosis that develops immediately after antibiotic abolition, the model with ampicillin and metronidazole is more adequate. Otherwise, ceftriaxone might be suitable to model chronic dysbiosis.

Today, all data concerning the long-term effects of antibiotics were determined by fecal microbial profile by molecular methods (sequencing, qPCR) and no results concerning the long-term effect in the mucosa-associated microbiota [11]. And for the first time there were showed the changes in the different groups of bacteria in the fecal and mucosa-associated microbiota of the colon and small intestine by cultural methods in one day and 8 weeks after antibiotic agents withdrawal. And there were showed that the mucosa-associated microbiota after ceftriaxone treatment has bigger changes than after the mix ampicillin with metronidazole.

Furthermore, earlier it has been shown that the changes occurring after parenteral use of antibiotics are deeper than their orally use [10]. That we confirmed in our study too.

The question of the long-term consequences of antibiotic therapy, in particular their mechanisms and the role of the intestinal microbiota, is a topical issue of modern medicine and, accordingly biomedical research. The basis for elucidation of the mechanisms of long-term consequences is the answer to the question of which antibiotic drugs or their combination in a clinically relevant dose may cause long-term changes. And perhaps it will help to explain experimental justification for the prescription of antibiotics.

### Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.



**В. О. Стецька, Ю. В. Голота, С. Ю. Гончар, М. Ю. Корбуш,  
Т. В. Довбинчук, Т. М. Сергійчук, Г. М. Толстанова**

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
ННЦ «Інститут біології та медицини»,  
вул. Володимирська 64/13, Київ, 01601, Україна,  
тел.: +38 (044) 521 35 98, email: gannatolstanova@knu.ua

## **ПОРІВНЯННЯ ДОВГОТРИВАЛОГО ЕФЕКТУ ДВОХ МОДЕЛЕЙ ДИСБІОЗУ У ЩУРІВ ЛІНІЇ W1STAR**

### **Реферат**

**Мета.** Порівняти зміни кишкової мікробіоти двох моделей дисбіозу, які були викликані цефтриаксоном (Цф) або сумішшю ампіциліну (Амп) та метронідазолу (Мет). **Методи.** Об'єктом дослідження була зміна фекальної та пристінкової мікробіоти товстої та тонкої кишок щурів-самців лінії Wistar ( $m=170-200$  г,  $n=19$ ). Цф вводили раз на добу впродовж 14 днів у дозі 300 мг/кг в.м. Суміш Амп (75 мг/кг) з Мет (50 мг/кг) вводили per os раз на добу, впродовж 3 діб. Виведення тварин з експерименту здійснювали через 1 та 56 діб після відміни введення речовин. Мікробіологічний аналіз фекального (КУО/г) та пристінкового (КУО/см<sup>2</sup>) біотопу щурів здійснювали бактеріологічним шляхом при висіві розведень на елективно-діагностичні середовища для *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *E. coli*, умовно-патогенних ентеробактерій, *Staphylococcus* та гемолітичних бактерій. **Результати.** Було показано, що зміни в фекальній мікробіоті після виведення Цф прогресували з часом і тривали до 56 доби спостереження. Введення Цф викликало зміни в кількості анаеробних бактерій *Bifidobacterium* і *Lactobacillus* вдвічі у просвітній мікробіоті товстої кишки. І спостерігався надмірний ріст бактерій в тонкому кишечнику через 56 діб. Суміш Амп/Мет індукувала дисбіоз одразу після відміни введення речовин. Нормалізація мікробіоти спостерігалася через 56 діб. Суміш Амп/Мет збільшувала лише кількість умовно-патогенних ентеробактерій і лактозо-позитивних *E. coli* в тонкому кишечнику через 56 діб після відміни введення речовин. **Висновки.** Введення суміші Амп/Мет щурам є більш адекватною моделлю для моделювання гострого дисбіозу. Введення Цф викликало глибокі довготривалі зміни і ця модель може бути придатною для моделювання хронічного дисбіозу.

*Ключові слова:* мікробіота, антибіотики, віддалені наслідки, дисбіоз.



**В. А. Стецкая, Ю. В. Голота, С. Ю. Гончар, М. Ю. Корбуш,  
Т. В. Довбинчук, Т. М. Сергійчук, Г. М. Толстанова**

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,  
ННЦ «Институт биологии и медицины»,  
ул. Владимирская 64/13, Киев, 01601, Украина,  
тел. : +38 (044) 521 35 98, e-mail: gannatolstanova@knu.ua

**СРАВНЕНИЕ ДОЛГОСРОЧНОГО ЭФФЕКТА ДВУХ  
МОДЕЛЕЙ ДИСБИОЗА У КРЫС ЛИНИИ WISTAR****Реферат**

**Цель.** Сравнить изменения кишечной микробиоты двух моделей дисбиоза, что были вызваны цефтриаксоном (Цф) или смесью ампициллина (Амп) с метронидазолом (Мет). **Методы.** Объектом исследования были изменения фекальной и пристеночной микробиоты толстой и тонкой кишок крыс-самцов линии Wistar ( $m=170-200$  г,  $n=22$ ). Цф вводили раз в сутки в течение 14 дней в дозе 300 мг/кг в.м. Коктейль Амп (75 мг/кг) с Мет (50 мг/кг) вводили *per os* раз в сутки, в течение 3 дней. Выводили животных из эксперимента через 1 и 56 дней после отмены введения веществ. Микробиологический анализ фекального (КОЕ/г) и пристеночного (КОЕ/см<sup>2</sup>) биотопа крыс осуществляли бактериологическим путем при посеве разведений на селективно-диагностические среды к *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *E.coli*, условно-патогенных энтеробактерий, *Staphylococcus* и гемолитических бактерий. **Результаты.** Показано, что изменения в фекальной микробиоте после вывода Цф прогрессировали со временем и продолжались до 56 дня наблюдения. Введение Цф вызвало изменения в количестве анаэробных бактерий *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* вдвое в просветной микробиоте толстой кишки. Наблюдался чрезмерный рост бактерий в тонком кишечнике через 56 дней. Смесь Амп/Мет индуцировала дисбиоз сразу же после отмены введения веществ. Нормализация микробиоты наблюдалась через 56 дней. Смесь Амп/Мет увеличивала только количество условно-патогенных энтеробактерий и лактозо-положительных *E. coli* в тонком кишечнике через 56 дней после отмены веществ. **Выводы.** Введение смеси Амп/Мет крысам является более адекватной моделью для моделирования острого дисбиоза. Введение Цф вызвали глубокие долговременные изменения и эта модель может быть пригодной для моделирования хронического дисбиоза.

*Ключевые слова:* микробиота, антибиотики, отдаленные последствия, дисбиоз.

**References**

1. Adike A, Di Baise JK. Small Intestinal Bacterial Overgrowth: Nutritional Implications, Diagnosis, and Management. *Gastroenterol Clin North Am.* 2018; 47(1):193-208. doi: 10.1016/j.gtc.2017.09.008.
2. Ershova IB, Mochalova AA, Osipova TF, Rezhnikov VA. Aktual'nye voprosy sovместnogo primeneniya antibakterial'nyh preparatov i probiotikov. *Aktual'na infektologija.* 2015; 3 (8):25-30 [In Russian].
3. Ermolenko E, Gromova L, Borshev Y, Voeikova A, Karaseva A, Ermolenko K, et al. Influence of Different Probiotic Lactic Acid Bacteria on Microbiota



and Metabolism of Rats with Dysbiosis. *Biosci Microbiota Food Health*. 2013; 32(2): 41–49. doi: 10.12938/bmfh.32.41.

4. Fletcher JR, Erwin S, Lanzas C, Theriot CM. Shifts in the Gut Metabolome and *Clostridium difficile* Transcriptome throughout Colonization and Infection in a Mouse Model. *mSphere*. 2018; 28;3(2). doi: 10.1128/mSphere.00089-18.

5. Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev*. 2017; 279(1):90-105. doi: 10.1111/imr.12563.

6. Korobkov NA. Rukovodstvo po pujerperiju. *SpecLit*, 2015:647 [In Russian].

7. Lankelma JM, van Vught LA, Belzer C, Schultz MJ, van der Poll T, de Vos WM, Wiersinga WJ. Critically ill patients demonstrate large interpersonal variation in intestinal microbiota dysregulation: a pilot study. *Intensive Care Med*. 2017; 43(1):59-68. doi: 10.1007/s00134-016-4613-z.

8. Naboka Y, Kogan M, Gudima I, Mitusova E, Bedjanian S, Ivanov S. Is there a relationship between the microbiota of urine and intestines in patients with acute obstructive pyelonephritis? *European Urology Supplements*. 2018; 17(2):e477-e478.

9. Nyrkova OI, Behtereva MK, Kvetnaja AS, Zhelezova LI. Antibiotik-associirovannye diarei: problemy i reshenija. *Voprosy sovremennoj pediatrii*. 2011; 10(5):54-62 [In Russian].

10. Panda S, Elkhader I, Casellas F, López Vivancos J, García Cors M, Santiago A, Cuenca S, Guarner F, Manichanh C. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS One*. 2014; 18;9(4):e95476. doi: 10.1371/journal.pone.0095476.

11. Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, Eismann K et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut*. 2013; 62(11):1591-601. doi: 10.4161/gmic.27128.

12. Putnikov AV, Holota YuV, Serhijchuk TM, Ostapchuk AM, Zakordonec LV, Ostapchenko LI, Tolstanova GM. Kil"kisni ta funkcional"ni pokaznyky kyshkovoyi normobioty shhuriv. *Mikrobiolohiya i biotexnologiya*. 2015; 2:89-100 [In Ukrainian]. doi: 10.18524/2307-4663.2015.2(30)48083.

13. Rashid MU, Zaura E, Buijs MJ, Keijsers BJ, Crielaard W, Nord CE, Weintraub A. Determining the long-term effect of antibiotic administration on the human normal intestinal microbiota using culture and pyrosequencing methods. *Clin Infect Dis*. 2015; 15;60(2):S77-84. doi: 10.1093/cid/civ137.

14. Theriot CM, Koenigsnecht MJ, Carlson PE Jr, Hatton GE, Nelson AM, Li B, Huffnagle GB, Z Li J, Young VB. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat Commun*. 2014; 5:3114. doi: 10.1038/ncomms4114.

15. William A. Craig. Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-spectrum cephalosporins. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1995; 22(1-2):89-96.

16. Zaharova IN, Berezhnaja IV, Sugjan NG. Antibiotik-associirovannye diarei u detej: chto novogo? *Medicinskij sovet*. 2017; 17:126-133 [In Russian].

Стаття надійшла до редакції 10.04.2019 р.



УДК 579.695

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

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,  
тел.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

## **ДЕСТРУКЦИЯ ФЕНОЛА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ПОЛИВИДОВОЙ БИОПЛЕНКИ НА ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЯХ В БИОФИЛЬТРЕ**

**Цель.** Определить эффективность процесса очистки воды от фенола микроорганизмами-деструкторами при формировании поливидовой биопленки на природных и синтетических носителях в биофильтре. **Методы.** В работе использовали ассоциацию бактерий-деструкторов фенола – *Aeromonas ichthiosmia* ONU552, *Bacillus subtilis* ONU551, *Pseudomonas maltophilia* ONU329, *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *Pseudomonas ceracia* ONU327. Окрашивание сформировавшихся биопленок осуществляли 1% раствором акридинового оранжевого. Микроскопию образцов проводили под флуоресцентным микроскопом Primo Star PC и световым микроскопом Carl Zeiss при увеличении  $\times 900$ , фотографировали с использованием камеры Olympus DCM (3,0 M pixels). Концентрацию фенола в воде определяли экстракционно-фотометрическим методом с использованием 4-аминоантипирина. **Результаты.** Методом флуоресцентной микроскопии подтверждено, что используемые для очистки воды бактерии-деструкторы фенола образовывали биопленку в биофильтре на носителях разной природы – керамических трубках, створках мидий, торфе, цеолите, активированном угле, синтетическом носителе типа ВИЯ, песке. В лабораторных условиях подтверждена эффективность работы колоночного биофильтра периодического действия проточно-восходящего типа с послойной комплексной загрузкой сорбентов при очистке фенол-содержащей воды (исходная концентрация фенола – 300 мг/л). Через 2 часа работы биофильтра степень очистки воды составляла 40% (остаточная концентрация фенола в воде  $180 \pm 17,2$  мг/л), что было связано с сорбцией фенола на носителях, в процессе биодеструкции она достигала 90% (остаточная концентрация фенола в воде –  $29,5 \pm 2,8$  мг/л) на 6-ой день. В последующие дни эффективность работы биофильтра при непрерывном поступлении загрязненной фенолом воды была на уровне 50-75%, и в стационарно-циклическом режиме достигала 80-90% (концентрация фенола в воде варьировала от  $29,5 \pm 2,8$  до  $60 \pm 5,7$  мг/л). **Вывод.** Новый микробный консорциум образует на природных и синтетических носителях фильтра биопленку, что способствует эффективной очистке воды от фенола и продолжительности работы биофильтра проточного типа (до 2 мес) без дополнительной регенерации.

*Ключевые слова:* очистка воды, бактерии-деструкторы фенола, биофильтр, биопленка, флуоресцентная микроскопия.





На сегодняшний день существенными загрязнителями водных экосистем являются фенол и его производные как побочные продукты предприятий нефтехимического комплекса, угольной и химической промышленности, производства фармацевтических препаратов, в связи с их токсичностью, устойчивостью и способностью накапливаться в окружающей среде [8]. Источниками поступления фенолов в природные водные объекты являются стоки производства фармацевтических препаратов, красителей, пестицидов, фенолформальдегидных смол и неионогенных поверхностно-активных веществ, предприятий нефтехимического комплекса, угольной промышленности, машиностроения, химической промышленности [13].

Для предотвращения негативного влияния и защиты окружающей среды от загрязнения токсичными ароматическими соединениями, в том числе фенольными, применяют биотехнологический метод с использованием прикрепленных к разным носителям микроорганизмов-деструкторов фенола [9, 10]. Преимущества иммобилизованных микроорганизмов-деструкторов в биотехнологических процессах очистки воды от органических поллютантов подробно описаны [12, 15]. Разработка биокаталитических систем привлекательна тем, что иммобилизация не оказывает стрессового влияния на клетки, носитель защищает их от прямого воздействия токсичных веществ и неблагоприятных факторов среды, повышается окислительная активность микробных клеток и эффективность очистки сточных вод [5, 14].

Микроорганизмы, обмениваясь друг с другом веществами, энергией, и как все живые организмы на нашей планете, подчиняются законам термодинамики, смысл которых сводится к высокой упорядоченности своих компонентов с целью сохранения определенного уровня энергии для противостояния энтропии, т.е. необратимому рассеиванию. Поэтому они вступают в различные симбиотические связи, позволяющие им выжить в разных условиях. Примером таких связей является образование биопленок (biofilms) на разных поверхностях. Биопленки представляют собой сообщества клеток микроорганизмов которые формируются на границе раздела фаз. Клетки в составе биопленок заключены в полимерный матрикс, в состав которого входят все классы биополимеров, с преобладанием различных полисахаридов [6].

Существует достаточно большое количество методов, позволяющих провести визуализацию сформировавшихся бактериальных пленок [2, 3]. К методам, которые визуализируют ультраструктуру микробных сообществ, можно отнести электронную микроскопию и конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (CLSM). Другие методы основаны на сорбции молекул специфического красителя на структурах биопленки, с последующей их отмывкой (десорбцией). Такой способ индикации биопленок наиболее часто используется в статических методах культивирования микробных биопленок и позволяет дать условную количественную характеристику образовавшимся микробным сообществам, т.е. чем больше образуется матрикс биопленки, тем больше красителя сорбируется на его поверхности [11].

Цель работы – определить эффективность процесса очистки воды от фенола микроорганизмами-деструкторами при формировании поливидовой биопленки на природных и синтетических носителях в биофилт্রে.



### Материалы и методы

В работе использовали ассоциацию из 5 штаммов бактерий-деструкторов фенола: *Aeromonas ichthiosmia* ONU552 и *Bacillus subtilis* ONU551 (выделены из сточной воды фармацевтического завода), *Pseudomonas maltophilia* ONU329 и *Pseudomonas fluorescens* ONU328 (выделены из морской воды), *Pseudomonas cepacia* ONU327 (выделен из почвы).

Для загрузки фильтра использовали легкодоступные, дешевые природные сорбенты – цеолит, створки мидий, песок, активированный уголь, торф верховой; и синтетические сорбенты – керамические трубки, синтетический носитель типа «ВИЯ» ТУ995990 [16]. Для экспериментов использовали цеолит с размером гранул 0,3–0,7 см; створки мидий с размером пластин 0,5–1,0 см; размер гранул активированного угля 3–4 мм; размеры керамических трубок: диаметр 8 мм, длина 10 мм, толщина стенок 1,5 мм.

Все сорбенты для загрузки фильтра и дальнейшей иммобилизации на них ассоциации микроорганизмов – деструкторов фенола подготавливали соответствующим образом. Синтетический носитель типа «ВИЯ» и торф верховой стерилизовали в течение 30 мин в автоклаве при 1 атм. Цеолит, песок речной, створки мидий сначала отмывали от мелкодисперсной фазы, затем стерилизовали в жаровом шкафу при температуре 180 °С; створки мидий обрабатывали при более высокой температуре 250–300 °С для выжигания органической фазы.

Для инокуляции загрузки биофильтра бактерии-деструкторы культивировали при температуре 28 °С в течение 2-х дней на среде М9 следующего состава (г/л):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1;  $\text{NaCl}$  – 0,5 – 2; пептон 10,0; глюкоза – 0,2.

Иммобилизацию бактерий – деструкторов на носителях в фильтре колоночного типа осуществляли при температуре 28 °С в течение 2-х дней, после чего остатки бактериальной суспензии сливали, а загрузку биофильтра трижды промывали от неприсоединенных клеток бактерий минеральной средой М9 без добавления пептона и глюкозы.

Все используемые сорбенты помещали в один фильтр. Многоуровневое распределение сорбентов (цеолит, створки мидий, синтетический носитель типа ВИЯ, активированный уголь, торф, керамические трубки, песок) в колоночном фильтре способствовало быстрому приросту микробиологического сообщества.

Перед процессом очистки воды от фенола в био фильтре была достигнута концентрация биомассы  $1 \times 10^9$  кл/г носителя. Биофильтр инокулировали в течение 2-х суток, пропуская через него бактериальную суспензию (скорость протока 3 мл/мин) с концентрацией  $1 \times 10^{12}$  кл/мл. После окончания инокуляции количество оставшихся клеток в инокуляте составляла  $10 \times 10^3$  кл/мл, таким образом на носителях биофильтра адсорбировалось  $1 \times 10^9$  кл/г. Порционный объем загрязненной фенолом воды, проходящей через биофильтр объемом 500 мл, составлял 230 мл.

После 10-дней использования проточного биофильтра для очистки фенолсодержащих вод носители были извлечены из реактора и обработаны 96% этанолом для фиксации биопленок. Затем носители окрашива-



ли погружением в 1% раствор акридинового оранжевого (3,6-акридиндиамин-N,N,N',N'-тетраметил) на 4 минуты, промывали водой и подсушивали на предметных стёклах [1].

Микроскопию образцов проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss и светового микроскопа Primo Star PC при увеличении 10×40, фотографировали с использованием камеры Olympus DCM (3,0 M pixels). Контролем служили стерильные носители и фиксированные мазки вышеперечисленных штаммов бактерий, обработанные 1% акридиновым оранжевым.

Эффективность процесса очистки воды от фенола биофильтром проточного типа оценивали по уравнению:

$$\alpha = [(C_0 - C) / C_0] \times 100\%, \quad (1)$$

где  $C_0$  и  $C$  – концентрации фенола в воде до (300 мг/л) и после обработки.

Концентрацию фенола определяли фотоколориметрическим методом, основанным на образовании окрашенных соединений фенола с 4-аминоантипирином в присутствии гексацианоферрата (III) при pH = 10,0 ± 0,2 [7].

Проводили три серии испытаний, n=3. Достоверность различий между средними значениями остаточной концентрации фенола в воде определяли по критерию Стьюдента на уровне значимости не менее 95% ( $p \leq 0,05$ ). Обработку данных осуществляли с использованием программы «Microsoft Office Excel 2003».

### Результаты и их обсуждение

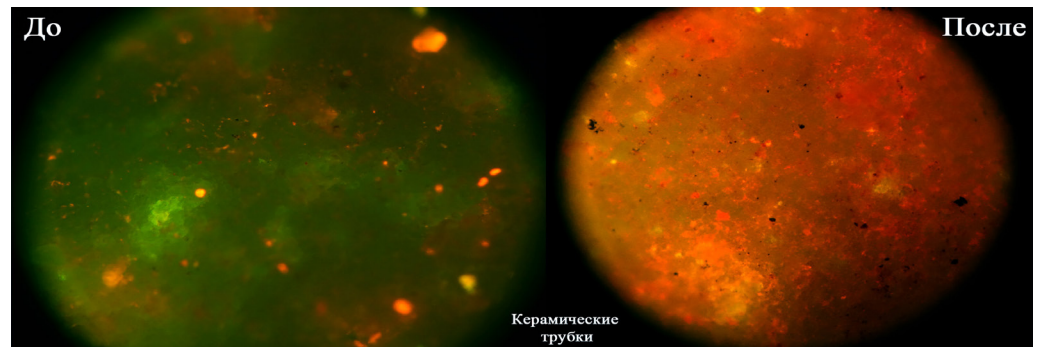
В результате исследований установлено, что на различных носителях биоплёнка образуется в разных объемах. Сравнительный анализ показал, что на песке и синтетическом носителе типа «ВИЯ» [16] иммобилизация бактерий-деструкторов фенола *A. ichthiosmia* ONU552, *B. subtilis* ONU551, *P. maltophilia* ONU329, *P. fluorescens* ONU328, *P. cepacia* ONU327 была слабо-выраженной, биопленка не формировалась.

Наиболее активное образование биоплёнки отмечалось на створках мидий, торфе и керамических трубках. На керамических трубках, входящих в состав комплексной загрузки действующего биореактора, формировался сплошной слой развитой биопленки ассоциации бактерий (рис. 1).

В процессе 10-дневного использования биофильтра для очистки воды от фенола адгезия бактерий и образование поливидовой биопленки регистрировалось также на торфе, цеолите и активированном угле.

Образование поливидовой бактериальной биопленки на носителях в биофильтре способствовало повышению эффективности его работы на протяжении длительного времени (2 мес.) без дополнительной регенерации и повторной инокуляции бактериями-деструкторами комплексной загрузки (рис. 2). Сохранение видового разнообразия использованной ассоциации штаммов микроорганизмов-деструкторов фенола на заключительной стадии работы биофильтра подтверждено высевом на агаризованную среду по морфологическим-культуральным и биохимическим признакам. Численность каждого из штаммов по окончании работы биофильтра достигала порядка  $5 \times 10^4$  кл/г сорбента.





**Рис. 1.** Биопленка ассоциации бактерий - деструкторов фенола на керамических трубках до и после инокуляции загрузки биофильтра. Окраска акридиновым оранжевым, увеличение 10x40

**Fig. 1.** Biofilm of bacteria – the destructors of phenol on the ceramic tubes before and after inoculation of the biofilter. Coloring with acridine orange, the increase of 10x40

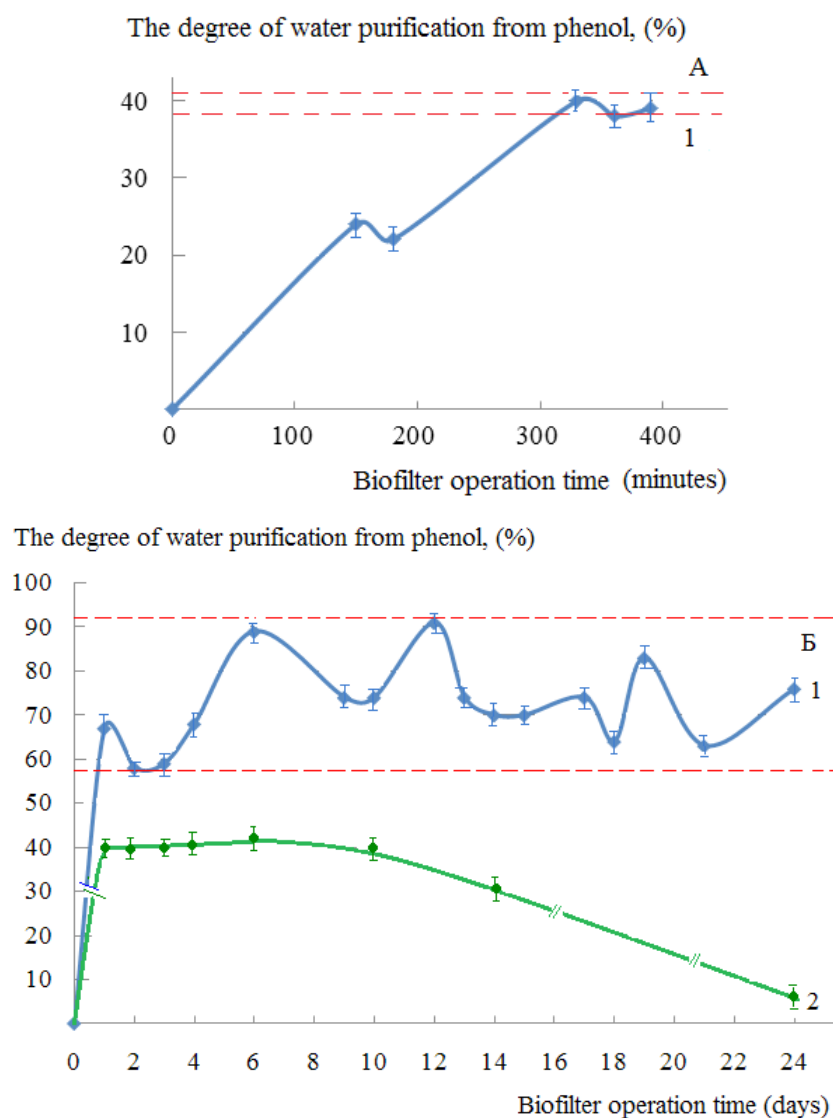
В лабораторных условиях исследована эффективность работы колонного биофильтра периодического действия проточно-восходящего типа с послойной модифицированной комплексной загрузкой при очистке фенол-содержащей воды (исходная концентрация фенола 300 мг/л).

Через 2 часа работы биофильтра со скоростью 10 мл/мин степень очистки воды от фенола в динамическом режиме составляла 40% (остаточная концентрация фенола в воде  $180 \pm 17,2$  мг/л), что было связано с сорбцией фенола на носителях (рис. 2, А). Через сутки работы биофильтра в стационарно-циклическом режиме степень очистки воды повышалась до 67% (остаточная концентрация фенола в воде –  $100 \pm 8,5$  мг/л), а на 6-ой день достигала максимального значения – 90% (остаточная концентрация фенола в воде –  $29,5 \pm 2,8$  мг/л) (рис. 2, Б).

В последующие дни эффективность работы биофильтра в динамическом режиме при непрерывном поступлении загрязненной фенолом воды была на уровне 50–75%, а в стационарно-циклическом режиме достигала 80–90%, концентрация фенола в воде варьировала от  $29,5 \pm 2,8$  мг/л до  $60 \pm 5,7$  мг/л (рис. 2, Б).

Полученные данные свидетельствуют о том, что основной механизм удаления фенола из загрязненной воды – это биодegradация его иммобилизованными микроорганизмами (*A. ichthiosmia* ONU552, *B. subtilis* ONU551, *P. maltophilia* ONU329, *P. fluorescens* ONU328, *P. ceracia* ONU327).

Методом флуоресцентной микроскопии с использованием красителя акридинового оранжевого подтверждено, что используемые в опытах бактерии-деструкторы фенола образовывали биопленку на носителях разной природы. На первом этапе происходила адгезия вегетативных форм бактерий, в последующем – формирование межклеточного матрикса биопленок. Можно полагать, что в период времени между 0,5 и 6 ч в биопленочной культуре происходил переход стадии адгезии клеток к началу формирования внеклеточного матрикса биопленки. При использовании керамических трубок в виде



**Рис. 2. Степень очистки фенол-содержащей воды в фильтре с иммобилизованными бактериями – деструкторами (1); нативными сорбентами (2)**  
 Примечание: исходная концентрация фенола в воде – 300 мг/л

**Fig. 2. The degree of purification of phenol-containing water in the filter with immobilized bacteria - destructors (1); native sorbents (2)**  
 Note: the initial concentration of phenol in water is 300 mg / l

колец, торфяных волокнистых структур биопленка, заполнившая петлеобразные структуры загрузки увеличивает ее рабочую поверхность, приобретает двухсторонний контакт с очищаемой водой, что увеличивает эффективность очистки воды от фенола.

Результаты наших исследований согласуются с данными работы [4], авторы которой наблюдали рост микроорганизмов на порошково-волокнистой

загрузке биофильтра. Ими также проведено исследование модифицированной загрузки биофильтра для интенсификации очистки локальных сточных вод и показано, что в петлеобразных структурах загрузки бактериальная пленка образует мостики, что говорит о направленном росте сообщества микроорганизмов, формирующих матрикс к противоположной стороне петли. Такое распределение бактерий в матриксе биопленки на полимерном петлеобразном материале, способствует синтезу РНК, и, следовательно, ведет к повышению метаболизма биопленки в целом.

Таким образом, микробный консорциум (*A. ichthiosmia* ONU552, *B. subtilis* ONU551, *P. maltophilia* ONU329, *P. fluorescens* ONU328, *P. cepacia* ONU327) образует на природных и синтетических носителях фильтра биопленку, что способствует повышению эффективности очистки воды от фенола (75–90%) и увеличению продолжительности работы биофильтра проточного типа (до 2 мес) без дополнительной регенерации.

Методом флуоресцентной микроскопии с использованием красителя акридинового оранжевого подтверждено, что используемые в опытах бактерии (*A. ichthiosmia* ONU552, *B. subtilis* ONU551, *P. maltophilia* ONU329, *P. fluorescens* ONU328, *P. cepacia* ONU327) – деструкторы фенола образовывали биопленки на носителях разной природы.

В лабораторных условиях подтверждена эффективность работы колонного биофильтра периодического действия проточно-восходящего типа с послойной модифицированной комплексной загрузкой при очистке фенол-содержащей воды (исходная концентрация фенола – 300 мг/л). Через 2 часа работы биофильтра степень очистки воды от фенола составляла 40% (остаточная концентрация фенола в воде  $180 \pm 17,2$  мг/л), через сутки – 67% (концентрация фенола в воде –  $100 \pm 8,5$  мг/л) и достигала максимального значения 90% (концентрация фенола в воде  $29,5 \pm 2,8$  мг/л) на 6-ой день очистки.

Ассоциация бактерий *A. ichthiosmia* ONU552, *B. subtilis* ONU551, *P. maltophilia* ONU329, *P. fluorescens* ONU328, *P. cepacia* ONU327 может быть использована для очистки фенол-содержащих сточных вод в биофильтре.

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

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

## **ДЕСТРУКЦІЯ ФЕНОЛУ ПРИ ФОРМУВАННІ ПОЛІВИДОВОЇ БІОПЛІВКИ НА ПРИРОДНИХ І СИНТЕТИЧНИХ НОСІЯХ У БІОФІЛЬТРАХ**

### **Реферат**

**Мета.** Визначити ефективність процесу очищення води від фенолу мікроорганізмами-деструкторами при формуванні полівидової біоплівки на природних і синтетичних носіях в біофільтрі. **Методи.** У роботі використовували асоціацію бактерій-деструкторів фенолу – *Aeromonas ichthiosmia* ONU552,



*Bacillus subtilis* ONU551, *Pseudomonas maltophilia* ONU329, *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *Pseudomonas cepacia* ONU327. Забарвлення сформованих біоплівки здійснювали 1% розчином акридинового помаранчевого. Мікроскопію зразків проводили під флуоресцентним мікроскопом Carl Zeiss і світловим мікроскопом Carl Zeiss, Primo Star з фото-фіксацією. Концентрацію фенолу у воді визначали екстракційно-фотометричним методом з використанням 4-аміноантипірину. **Результати.** Методом флуоресцентної мікроскопії підтверджено, що використані для очищення води від фенолу бактерії-деструктори утворювали біоплівку в біофільтрі на носіях різної природи – керамічних трубках, мушлях мідій, торфі, цеоліті, активованому вугіллі, синтетичному носії типу «ВІА», піску. У лабораторних умовах доведено ефективність роботи колоночного біофільтра періодичної дії проточно-вихідного типу з пошаровим комплексним завантаженням сорбентів при очищенні фенол-вмісної води (вихідна концентрація фенолу – 300 мг/л). Через 2 години роботи біофільтра ступінь очищення води становив 40% (залишкова концентрація фенолу у воді  $180 \pm 17,2$  мг/л), що було пов'язано з сорбцією фенолу на носіях, в процесі біодеструкції вона сягала 90% (залишкова концентрація фенолу у воді –  $29,5 \pm 2,8$  мг/л) на 6-ий день. У наступні дні ефективність роботи біофільтра при безперервному надходженні забрудненої фенолом води була на рівні 50–75%, і в стаціонарно-циклічному режимі сягала 80–90% (концентрація фенолу у воді варіювала від  $29,5 \pm 2,8$  мг/л до  $60 \pm 5,7$  мг/л). **Висновок.** Новий мікробний консорціум утворює на природних і синтетичних носіях фільтра біоплівку, що сприяє ефективному очищенню води від фенолу і тривалості роботи біофільтра проточного типу (до 2 міс) без додаткової регенерації.

Ключові слова: очищення води, бактерії - деструктори фенолу, біофільтр, біоплівка, флуоресцентна мікроскопія

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

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

## DESTRUCTION OF PHENOL AT THE FORMATION OF POLYVIDIOUS BIOFILM ON NATURAL AND SYNTHETIC CARRIERS IN THE BIOFILTER

### Summary

**Aim.** To determine the effectiveness of the process of water purification from phenol by microorganisms-destroyers in the formation of a polyvidiofilm biofilm on natural and synthetic carriers in a biofilter. **Methods.** An association of phenol bacterium destroyers — *Aeromonas ichthiosmia* ONU552, *Bacillus subtilis* ONU551, *Pseudomonas maltophilia* ONU329, *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *Pseudomonas cepacia* ONU327 was used. Stained biofilms were stained with 1% acridine orange solution. Microscopy of the samples was carried out under a Carl Zeiss fluorescence microscope and a Carl Zeiss, Primo Star light



microscope with photo fixation. The concentration of phenol in water was determined by the extraction-photometric method using 4-aminoantipyrin. **Results.** Using fluorescence microscopy, it was confirmed that bacteria used for purification of water from phenol - destructors formed a biofilm in a biofilter on carriers of different nature – ceramic tubes, mussel valves, peat, zeolite, activated carbon, synthetic media such as "VIYA", sand. In laboratory conditions, the effectiveness of the operation of a column-based biofilter of flow-up-stage type with layer-by-layer complex loading of sorbents during purification of phenol-containing water (initial concentration of phenol – 300 mg/l) was confirmed. After 2 hours of the biofilter operation, the degree of water purification was 40% (residual phenol concentration in water  $180 \pm 17.2$  mg/l), which was associated with phenol sorption on carriers; during biodegradation, it reached 90% (residual phenol concentration in water –  $29.5 \pm 2.8$  mg/l) on the 6th day. In the following days, the efficiency of the biofilter with continuous intake of phenol-contaminated water was at the level of 50–75%, and in the stationary-cyclic mode reached 80–90% (the concentration of phenol in the water varied from  $29.5 \pm 2.8$  to  $60 \pm 5.7$  mg/l). **Conclusion.** The new microbial consortium forms a biofilm on natural and synthetic filter carriers, which contributes to the effective purification of water from phenol and the flow-through biofilter operation time (up to 2 months) without additional regeneration.

*Key words:* water purification, bacteria - phenol destructors, biofilter, biofilms, fluorescence microscopy

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие / Марданова А.М. с соавт. – Казань: К(П)ФУ, 2016. – 42 с.
2. Ерохин П. С., Кузнецов О. С., Коннов Н. П., Видяева Н. А., Уткин Д. В. Комплексный подход к изучению биопленок микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. – 2012. – Т. 12, № 1. – С. 42–46.
3. Павлова И. Б., Толмачева Г. М., Ленченко Е. М. Экспериментальное исследование процессов формирования биопленок *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (световая и сканирующая электронная микроскопия) // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2016. - №4(20). – С. 65–73
4. Пукемо М. М., Симаков Ю. Г., Алексеев Е. В. Фрактальный рост микроорганизмов на порошково-волоконистой загрузке биофильтра и интенсификацию очистки сточных вод // Инновации и инвестиции. – 2015. – № 6. – С. 181–185.
5. Серебренникова М. К. Биодegradация нефтяных углеводородов иммобилизованными родококками в колоночном биореакторе ... Автореф. дис. канд. биол. наук: 03.02.03 – микробиология, Пермь – 2014. – 23 с.
6. Соколова Т. Н. Микробные биопленки и способы их обнаружения // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2014. – № 4. – С. 12–15.
7. Фомин Г. С. Вода. Контроль химической, бактериологической и радиационной безопасности по международным стандартам: Энциклопедический





справочник. 3-изд. М., 2000. – 839 с.

8. Часова Э. В., Ивчук В. В. Эколого-химические характеристики и методы защиты окружающей среды от фенола // Вестник Криворожского национального университета. – 2013. – № 34(1). – С. 209–213.

9. Aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacteria (*Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*) in fluidized bed bioreactor / J. Taoufik [et al] // Annals of Microbiology. – 2004. – Vol. 54, № 2. – P. 189–200.

10. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized in an air-stirred reactor with clarifier / M.B. Prieto [et al] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2002a. – Vol. 58, № 6. – P. 853–859.

11. Camargo A. C. Biofilm formation on catheters used after cesarean section as observed by scanning electron microscopy / A.C. Camargo, E.L. Pizzolitto // International J. of Gynecology and Obstetrics. – 2005. Vol. 90. – P. 148–149.

12. Degradation of phenol by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized on Biolite in packed-bed reactor / M.B. Prieto [et al] // Journal of Biotechnology. – 2002b. – Vol. 97, № 1. – P. 1–11.

13. Gudzenko Tatyana, Wolodymyr Iwanycja, Olga Woljuwacz, Boris Galkin, Olga Zuk, Elena Gorszkowa. Biodegradacja fenoli i innych cyklicznych związków aromatycznych. – Publisher: GlobeEdit is a trademark of International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group, 17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius. (ISBN: 978-613-8-25347-1). – 2018. – 85 p.

14. Nor Suhaila Yaacob, Rosfarizan Mohamad, Siti Aqlima Ahmad. The influence of different modes of bioreactor operation on the efficiency of phenol degradation by *Rhodococcus* UKMP-5M // Rendiconti Lincei. – 2016. – 27(4). – P. 749–760.

15. Songwen Tan, Xuncai Chen, Chunzhi Cui, Yang Hou, Weiguo Li, Hong You. Biodegradation of saline phenolic wastewater in a biological contact oxidation reactor with immobilized cells of *Oceanimonas sp.* // Biotechnology Letters – 2017. – Vol. 39, Issue 1, P. 91–96.

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

## References

1. Bioplenki: Biofilms: basic research methods: teaching aid / Mardanova AM. s soavt. Kazan': K(P)FU, 2016: 42 [in Russian].

2. Erohin PS, Kuznecov OS, Konnov NP, Vidjaeva NA, Utkin DV. An integrated approach to the study of microbial biofilms by atomic force microscopy. Izvestija Saratovskogo universiteta. Novaja serija. Serija: Fizika. 2012;12(1):42–46 [in Russian].

3. Pavlova IB, Tolmacheva GM, Lenchenko EM. Experimental study of the formation of biofilms *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (light and scanning electron microscopy). Problemy veterinarnoj sanitarii, gigieny i jekologii. 2016;4(20):65-73 [in Russian].

4. Pukemo MM, Simakov JuG, Alekseev EV. Fractal growth of microorgan-



isms on the powder-fiber loading of the biofilter and intensification of wastewater treatment *Innovacii i investicii*. 2015;6:181–185 [in Russian].

5. Cerebrennikova MK. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by immobilized rhodococci in a column bioreactor. *Avtoref. dis. kand. biol. nauk: 03.02.03 – mikrobiologija*, Perm' 2014:23. [in Russian].

6. Sokolova TN. Microbial biofilms and methods for their detection *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. 2014;4:12–15. [in Russian].

7. Fomin GS. Voda. Kontrol' himicheskoy, bakteriologicheskoy i radiacionnoj bezopasnosti po mezhdunarodnym standartam: *Jenciklopedicheskij spravochnik*. 3-izd. M., 2000:839. [in Russian].

8. Chasova JeV, Ivchuk VV. Ecological and chemical characteristics and methods of environmental protection from phenol. *Vestnik Krivorozhskogo nacional'nogo universiteta*. 2013;34(1):209–213. [in Russian].

9. Aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacteria (*Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*) in fluidized bed bioreactor / J. Taoufik [et al]. *Annals of Microbiology*. 2004;54(2):189–200.

10. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized in an air-stirred reactor with clarifier / MB. Prieto [et al]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002a;58(6):853–859.

11. Camargo AC, Pizzolitto EL. Biofilm formation on catheters used after cesarean section as observed by scanning electron microscopy. *International J. of Gynecology and Obstetrics*. 2005;90:148–149.

12. Degradation of phenol by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized on Biolite in packed-bed reactor / MB. Prieto [et al]. *Journal of Biotechnology*. 2002b;97(1):1–11.

13. Gudzenko Tatyana, Wolodymyr Iwanycja, Olga Woljuwacz, Boris Galkin, Olga Zuk, Elena Gorszkowa. Biodegradacja fenoli i nnych cyklicznych związków aromatycznych. - Publisher: GlobeEdit is a trademark of International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group, 17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius. 2018:85.

14. Nor Suhaila Yaacob, Rosfarizan Mohamad, Siti Aqlima Ahmad . The influence of different modes of bioreactor operation on the efficiency of phenol degradation by *Rhodococcus* UKMP-5M. *Rendiconti Lincei*. 2016;27(4):749–760.

15. Songwen Tan, Xuncui Chen, Chunzhi Cui, Yang Hou, Weiguo Li, Hong You. Biodegradation of saline phenolic wastewater in a biological contact oxidation reactor with immobilized cells of *Oceanimonas sp.* *Biotechnology Letters*. 2017;39(1):91–96.

16. Patent of Ukrai'ny №97747. Method of aerobic biological treatment of sewage / Gvozdyak PI, Globa LI, Sablij LA, Kaparnyk AI, Borysenko OO, Zhukova VS. *Opubl.* 12.03.2012. *Byul.* № 5 [in Ukrainian].

Стаття надійшла до редакції 20.07.2019 р.



**І. В. Акуленко<sup>1</sup>, М. Ю. Корбуш<sup>1</sup>, В. О. Стецька<sup>1</sup>,  
Т. М. Сергійчук<sup>1</sup>, Г. М. Толстанова<sup>1</sup>, Н. М. Степанова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
вул. Володимирська, 64/13, Київ, 01601, Україна,  
тел.: +38 (044) 239 33 33,

<sup>2</sup>Державна установа “Інститут нефрології Національної академії медичних наук  
України”, вул. Дегтярівська, 17-В, Київ, 04050, Україна,  
тел.: +38 (044) 225 93 77, e-mail: estee23@gmail.com

## **ВПЛИВ АНТИБІОТИКОТЕРАПІЇ НА ЗАГАЛЬНУ КІЛЬКІСТЬ ОКСАЛАТДЕГРАДУВАЛЬНОЇ МІКРОБІОТИ У КИШКОВОМУ ТРАКТІ ЩУРІВ**

**Мета.** Дослідити зміни загальної кількості оксалатдеградувальних бактерій за модельованого дисбіозу у щурів. **Методи.** Об'єктом дослідження були зміни загальної кількості оксалатдеградувальної мікробіоти фекального та пристінкового біоплатів товстої та тонкої кишок щурів самців лінії Wistar (маса 170-200 г, n=7). Коктейль ампіциліну (75 мг/кг) з метронідазолом (50 мг/кг) вводили per os 1 раз на добу, впродовж 3 днів. Динаміку змін мікробіоти оцінювали одразу після відміни введення антимікробних препаратів та на 18, 29, 59 день від початку експерименту. Мікробіологічний аналіз фекального (КУО/г) та пристінкового (КУО/см<sup>2</sup>) біоплатів щурів здійснювали бактеріологічним шляхом при висіві відповідних розведень на елективні середовища. Результати представлені у вигляді  $M \pm m \lg \text{ КУО/г}$  (см<sup>2</sup>). **Результати.** Кількість бактерій, що висівалася з фекального біоплату на високо селективному середовищі Oxalate Medium (5 г/л Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) знижувалася на 29-й день експерименту з  $6,22 \pm 0,20$  до  $4,37 \pm 0,80 \lg \text{ КУО/г}$  ( $P < 0,05$ ) і залишалася нижчою за показники у відповідній контрольній групі на 59-й день експерименту. Достовірне зниження кількості оксалатдеградувальної мікробіоти (з  $7,05 \pm 0,35$  до  $5,13 \pm 0,05 \lg \text{ КУО/см}^2$ ,  $P < 0,05$ ) реєстрували у пристінковому біоплаті товстої кишки на 59-й день експерименту. Проте у пристінковому біоплаті тонкої кишки їх кількість була в межах контрольних значень. Кількість анаеробних цукролітичних бактерій родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, що здатні метаболізувати оксалат, залишалася в межах контрольних значень у фекальному та пристінковому біоплатах товстої та тонкої кишок впродовж всього періоду спостереження після відміни антибіотиків. **Висновок.** За антибіотикоасоційованого дисбіозу відбувається зниження загальної кількості оксалатдеградувальних бактерій, що прогресує в часі і може стати причиною утворення оксалатних конкрементів.

*Ключові слова:* оксалат, оксалатдеградувальні бактерії, дисбіоз.

Останнім часом дослідники всього світу звертають увагу, що наслідки порушення мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту не обмежуються

© І. В. Акуленко, М. Ю. Корбуш, В. О. Стецька, Т. М. Сергійчук, Г. М. Толстанова, Н. М. Степанова, 2019



кишечником. Одним з органів мішеней за такої патології є нирки [3]. Розглядається патогенетичний механізм розвитку кишкових патологій та хронічних захворювань нирок, наприклад, зміни кишкової мікробіоти, модуляції імунної та запальної відповіді вітаміном Д та інші механізми [11]. Особлива увага приділяється найбільш частому нирковому ускладненню при захворюваннях кишечника – сечокам'яній хворобі. Показано, що за запальних захворювань кишечника ризик розвитку сечокам'яної хвороби зростає в 10–100 разів [7]. Відомо, що найчастіше за кишкової патології формуються оксалатні та уратні конкременти.

Щавелева кислота здатна зв'язуватись з різними катіонами (такими як натрій, магній, калій, кальцій) та утворювати оксалатні солі. Надлишок оксалатів виводиться переважно нирками і частково через травний тракт. Всмоктування оксалатів відбувається по всьому шлунково-кишковому тракту. В товстій кишці вони можуть як абсорбуватися, так і секретуватися. Проте, провідна роль відводиться тонкій кишці, де всмоктується 2–18% всього екзогенного оксалату [2].

Альтернативний шлях регуляції метаболізму оксалату полягає в його деградації за рахунок бактерій представників кишкової нормобіоти (*Oxalobacter formigenes*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та ін.). Ці бактерії зменшують абсорбцію дієтичного оксалату і тим самим знижують ризик розвитку гіпероксалуриї, і як наслідок утворення кальцій-оксалатних конкрементів [14]. Показано, що окрім безпосереднього використання оксалатів *O. formigenes* збільшує кишкову секрецію та зменшує реадсорбцію оксалатів шляхом впливу на Cl-оксалатний обмінник (SLC26A6), який розташований на клітинах кишкового епітелію [8]. Встановлено, що колонізація товстої кишки *O. formigenes* більш ніж втричі зменшує концентрацію оксалатів в плазмі крові та достовірно знижує ризик утворення оксалатних каменів. Проте, нез'ясованим залишається яким чином відбувається заселення кишечника *O. formigenes*, які фактори, крім дієтичного вживання оксалатів, впливають на його популяцію, як змінюється заселення кишечника за різних кишкових патологій [12].

На даний час недостатньо вивченим є вплив антибіотичних препаратів та інших факторів, що змінюють біоценоз кишечника на розвиток оксалатного уротіліазу. Висловлюється припущення, що менша заселеність *O. formigenes* дорослого населення України порівняно з дитячою віковою категорією пов'язана саме з частим та неконтрольованим використанням антибіотиків дорослими. Також дослідники наголошують на тому, що у людей, які приймали антибіотики реєструється менша частота виявлення *O. formigenes* і більша частота розвитку нефролітіазу.

Останні дослідження показують вплив антибіотиків на кількісні показники *O. formigenes* у шлунково-кишковому тракту дослідних тварин. Виявлено його чутливість до хінолонів, макролідів, тетрациклінів і метронідазолу [13]. Проте, інформації про вплив антибіотикотерапії на загальний рівень оксалатдеградувальних бактерій немає.

Тому, метою даного дослідження було вивчити зміни загальної кількості оксалатдеградувальних бактерій за модельованого дисбіозу у щурів.



### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження була оксалатдеградувальна мікробіота фекального та пристінкового біопатів товстої та тонкої кишок щурів самців лінії Wistar (розведення віварію Національного медичного університету ім. А. А. Богомольця) (маса 170–200 г, n=7). Тварин утримували в стандартних умовах віварію ННЦ «Інститут біології та медицини», на стандартному раціоні харчування з вільним доступом до води. Тварини були поділені дві групи. В дослідній групі тварин (n=4) дисбіотичні зміни моделювали шляхом сумісного внутрішньом'язового (в/м) введення ампіциліну (ПАТ «Київмедпрепарат», Україна) у дозі 75 мг/кг та метронідазолу (ТОВ «Фармацевтична фірма «Здоров'я», Україна) у дозі 50 мг/кг, які вводили перорально у вигляді коктейлю 1 раз на добу впродовж 3 днів [10]. Контрольній групі тварин (n=3) вводили в/м 0,1 мл води для ін'єкцій. Початком експерименту вважався перший день введення антимікробних препаратів або води для ін'єкцій (для контрольної групи). Мікробіоту фекального біопату досліджували наступного дня після відміни введення антибіотиків (4-й день експерименту), а також на 18-й, 29-й та 59-й день від початку експерименту. Пристінкову мікробіоту товстої та тонкої кишок досліджували на 59-й день при виведенні тварин з експерименту. Тварин виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації.

Для мікробіологічного аналізу було відібрано 1 г фекалій та ділянки слизової оболонки – 1 см<sup>2</sup> товстої кишки на відстані 2 см від анального отвору та 1 см<sup>2</sup> тонкої кишки на відстані 2 см від ілеоцекального клапану, які тричі промивали від хімусу у фізіологічному розчині після чого гомогенізували у гомогенізаторі Поттера. З отриманих зразків робили 10-кратні розведення у фізіологічному розчині і висівали на відповідні елективні середовища.

Для визначення кількості представників роду *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* використовували комерційні елективні середовища *Lactobacillus* MRS Agar та *Bifidobacterium* Agar виробництва HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Індія. Кількість оксалатдеградувальних бактерій визначали на високо селективному середовищі *Oxalate Medium* (г/л): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,25, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,5, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O – 0,025, CH<sub>3</sub>COONa – 0,82, дріжджовий екстракт – 1,0, резазурин – 0,001, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 4, L-цистеїн-HCl – 0,5 та Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> – 5 г. Розчин мікроелементів (Trace element solution) – 1 мл з наступним складом на л: HCl (25%; 7,7 M) – 10,00 мл, FeCl<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O – 1,50 г, ZnCl<sub>2</sub> – 70,00 мг, MnCl<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O – 100,00 мг, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 6,00 мг, CoCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O – 190,00 мг, CuCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O – 2,00 мг, NiCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O – 24,00 мг, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O – 36,00 мг [6]. Посіви здійснювали глибинним шляхом. Культивування проводили за анаеробних умов в анаеростатах з використанням газогенеруючих пакетів (BioMerieux, Франція) при 37 °C, 5 діб. Враховували колонії, що виростили на дні/товщі чашки. Результати представлені у вигляді M±m lg КУО/г (см<sup>2</sup>).

Стійкість біфідо- та лактобактерій, виділених від щурів до ампіциліну та метронідазолу визначали диско-дифузійним методом на *Lactobacillus* MRS Agar та *Bifidobacterium* Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Індія), використовуючи комерційні диски (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Індія). З добової культури бактерій готували бактеріальну суспензію у фізіологічному розчині за стандартом мутності МакФарланда 2 до концентрації 1,5×10<sup>8</sup> клітин/мл.



Отриману суспензію (0,1 мл) засівали газом на поверхню середовища й за допомогою стерильного пінцета розкладали диски з антибіотиками.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програм «Statistica 6.0» з урахуванням перевірки показників на нормальний розподіл за тестом Колмогорова-Смірнова. Для порівняння вибірок підраховували середнє арифметичне та середнє статистичне відхилення. Достовірність різниці між порівнюваними групами оцінювали за допомогою  $t$  критерію Стьюдента. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю  $P < 0,05$ .

### Результати та обговорення

В попередніх дослідженнях нами було показано, що 100% висівання оксалатдеградувальних бактерій (ОДБ) відмічається лише у шурів лінії Wistar [1], тому саме ця лінія була відібрана для дослідження змін мікробіоти шлунково-кишкового тракту за модельованого дисбіозу.

Для дослідження загальної кількості ОДБ у фекальному біоптаті проводили забір фекалій в 4-х точках впродовж 59 діб. Важливо зауважити, що у шурів контрольної групи в 3-х перших точках кількість ОДБ була стабільною і дорівнювала: на 4-у добу експерименту  $6,75 \pm 0,20 \lg \text{ КУО/г}$ ; на 18-у –  $6,52 \pm 0,39 \lg \text{ КУО/г}$ ; та на 29-у –  $6,61 \pm 0,10 \lg \text{ КУО/г}$ . Проте, на 59-й день експерименту спостерігалось підвищення на 1 порядок кількості ОДБ до  $7,80 \pm 0,45 \lg \text{ КУО/г}$  (рис. 1), але це збільшення не досягало статистично вірогідної різниці і скоріше за все могло бути пов'язано зі зміною раціону харчування тварин. В попередніх дослідженнях нами було показано індивідуальний характер між кількістю оксалатдеградувальних бактерій та раціону харчування. Середні показники вмісту оксалатдеградувальних бактерій достовірно зростали при щоденному підвищеному вмісті  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (2 мг/кг) у раціоні харчування тварин [1].

При дослідженні впливу антимікробної композиції метронідазолу з ампіциліном на загальну кількість ОДБ у фекальному біоптаті, було продемонстровано поступове їх зниження в порівнянні з показниками в контрольній групі.

Так, на 4-й та 18-й дні від початку введення антимікробних препаратів відмічали лише тенденцію до зниження кількості ОДБ у фекальному біоптаті. На 29-ий день експерименту кількість ОДБ у дослідній групі знизилася на 2 порядки в порівнянні з показниками в контрольній групі і становила  $4,37 \pm 0,80 \lg \text{ КУО/г}$  ( $P < 0,05$ ). На 59-й день кількість ОДБ у дослідній групі становила  $6,03 \pm 0,18 \lg \text{ КУО/г}$ , що на 1,8 порядку була нижчою за показники у відповідній контрольній групі ( $P < 0,05$ ) (рис. 1).

Відомо, що у просвітному біоптаті найбільша кількість ОДБ виявляється у товстій кишці. Проте на даний момент відсутні відомості про кількісні значення ОДБ у пристінковому біоптаті товстої та тонкої кишок.

Достовірне зниження кількості ОДБ реєстрували у пристінковому біоптаті товстої кишки на 59-й день експерименту. У дослідній групі, кількість ОДБ становила  $5,13 \pm 0,05 \lg \text{ КУО/см}^2$ , тоді як в контрольній групі –  $7,05 \pm 0,35 \lg \text{ КУО/см}^2$ . Проте у пристінковому біоптаті тонкої кишки кількість ОДБ була



в межах контрольних значень, зокрема  $7,34 \pm 0,04$  lg КУО/см<sup>2</sup> в контролі та  $7,22 \pm 0,34$  lg КУО/см<sup>2</sup> в дослідній групі (рис. 2).

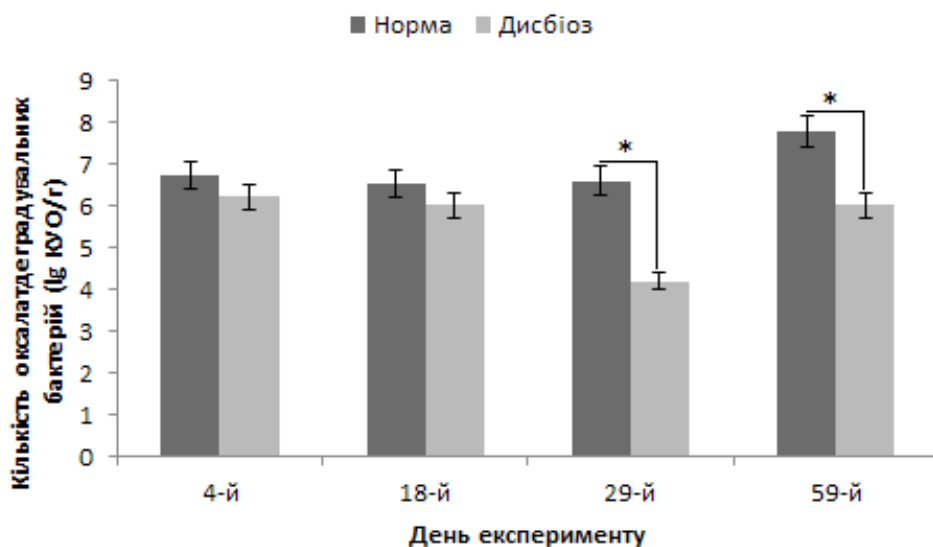


Рис. 1. Кількість оксалатдеградувальних бактерій у фекальному біоптаті щурів (n=7) в різні терміни після введення комбінації антибіотиків ампіциліну (75 мг/кг) та метронідазолу (50 мг/кг), lg (M±m) КУО/г, \*P<0,05

Fig. 1. Quantity of oxalate-degrading bacteria in the fecal biotope of rats (n=7) at different time points after administration of the combination of antibiotics ampicillin (75 mg/kg) and metronidazole (50 mg/kg), lg (M±m) CFU/g, \*P <0,05

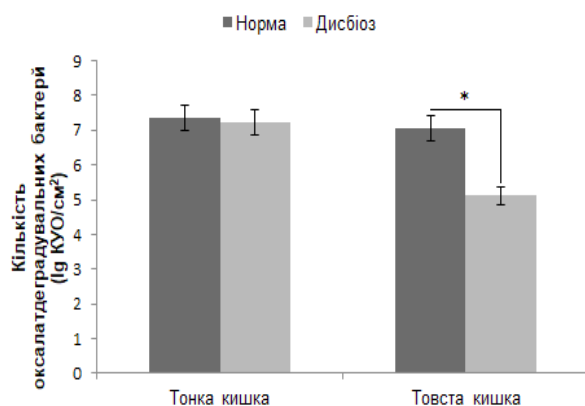


Рис. 2. Кількість оксалатдеградувальних бактерій у пристінковому біоптаті кишечника щурів (n=7) на 59-й день після відміни комбінації антибіотиків ампіциліну (75 мг/кг) та метронідазолу (50 мг/кг), lg (M±m) КУО/см<sup>2</sup>, \*P<0,05

Fig. 2. Quantity of oxalate-degrading bacteria in the mucosa-associated biotope of rats (n=7) on the 59-th day after administration of the combination of antibiotics ampicillin (75 mg/kg) and metronidazole (50 mg/kg), lg (M ± m) CFU/cm<sup>2</sup>, \*P <0,05

З літературних джерел відомо, що навіть короткотривале застосування антибіотиків призводить до виражених змін мікробіоти шлунково-кишкового тракту і має довготривалі наслідки [9], нами вперше встановлено тривалі зміни у складі ОДБ після антибіотикотерапії.

Анаеробним цукролітичним бактеріям родів *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* відводиться одна з провідних ролей у здатності до деградації оксалату [14]. Нами показано, що кількість бактерій родів *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* після сумісного введення ампіциліну та метронідазолу залишалася в межах контрольних значень у всіх досліджуваних біотопах та періодах (табл. 1, 2).

Таблиця 1

Кількісні показники ( $M \pm m$  lg КУО/г) *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* у фекальному біотопі контрольних (n=3) та дослідних (n=4) щурів після сумісного введення ампіциліну з метранідазолом

Table 1

Quantitative indices of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* ( $M \pm m$  lg CFU/g) in fecal biotope of control (n=3) and experimental (n=4) rats after administration of ampicillin with metranidazole

Рід	Контроль (n=3)				Дисбіоз (n=4)			
	4-й день	18-й день	29-й день	59-й день	4-й день	18-й день	29-й день	59-й день
<i>Bifidobacterium</i>	8,26± 0,20	8,26± 0,20	8,49± 0,57	8,37± 0,24	8,99± 0,31	9,22± 0,34	9,07± 0,38	8,65± 0,62
<i>Lactobacillus</i>	7,89± 0,24	7,31± 0,38	8,36± 0,51	7,56± 0,40	8,75± 0,06	8,20± 0,08	8,03± 0,12	7,92± 0,44

Таблиця 2

Кількісні показники ( $M \pm m$  lg КУО/см<sup>2</sup>) *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* у пристінковому біоптатах товстої та тонкої кишки щурів (n=7) після сумісного введення ампіциліну з метранідазолом

Table 2

Quantitative indices of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* ( $M \pm m$  lg CFU/cm<sup>2</sup>) in mucosa-associated biotope of rats (n=7) after administration of ampicillin with metranidazole

Пристінковий біоптат	Рід мікроорганізмів	Контроль (59-й день, n=3)	Дисбіоз (59-й день, n=4)
Товстої кишки	<i>Bifidobacterium</i>	4,23±0,75	4,05±0,25
	<i>Lactobacillus</i>	3,87±0,42	3,90±0,14
Тонкої кишки	<i>Bifidobacterium</i>	5,03±0,01	4,93±0,34
	<i>Lactobacillus</i>	5,17±0,78	5,42±0,08





При дослідженні стійкості виділених лакто- та біфідобактерій до ампіциліну та метронідазолу було виявлено, що дані бактерії стійкі до відповідних антибіотиків.

Можна припустити, що загальна кількість лакто- та біфідобактерій залишається в нормі впродовж всього часу експерименту саме за рахунок їх стійкості до використаних антибіотиків. В той час, як загальна кількість ОДБ (до яких відносяться не лише *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Oxalobacter formigenes*, а також *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Providencia rettgeri*, *Eubacterium lentum* та ін. [5]) знижується впродовж експерименту. З іншого боку, ми визначали загальну кількість лакто- і біфідобактерій без видової приналежності на середовищах MRS Agar та Bifidobacterium Agar, відповідно ми не можемо виключити зменшення кількості тих видів і штамів лакто- і біфідобактерій, які здатні метаболізувати оксалат. Що підтверджується даними інших авторів [15], які показали різницю у рівні метаболічної активності по відношенню до оксалату серед різних штамів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*.

При застосуванні комбінації антибіотичних препаратів ампіциліну та метронідазолу відбувається зменшення у кількісному складі ОДБ фекального біоптату, які набувають більш виразних змін у віддалені терміни зокрема на 29-й та 59-й дні експерименту і торкаються також пристінкового біоптату товстої кишки. При цьому загальна кількість лакто- і біфідобактерій залишається в межах контрольних показників.

Отже, отримані нами експериментальні дані свідчать про довготривалі зсуви у кількості ОДБ після антибіотикотерапії, що може мати клінічно-релеванті наслідки, зокрема розвиток гіпероксалурії з наступним утворенням оксалатних конкрементів.

**И. В. Акуленко<sup>1</sup>, М. Ю. Корбуш<sup>1</sup>, В. А. Стецька<sup>1</sup>,  
Т. М. Сергийчук<sup>1</sup>, А. Н. Толстанова<sup>1</sup>, Н. М. Степанова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,  
ул. Владимирская, 64/13, Киев, 01601, Украина, тел.: +38 (044) 239 33 33,

<sup>2</sup>Государственное учреждение “Институт нефрологии Национальной академии медицинских наук Украины”, ул. Дегтярёвская, 17-В, Киев, 04050, Украина,  
тел.: +38 (044) 225 93 77, e-mail: estee23@gmail.com

## **ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ НА ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО ОКСАЛАТДЕГРАДИРУЮЩЕЙ МИКРОБИОТЫ В КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ КРЫС**

### **Реферат**

**Цель.** Исследовать динамику изменения общего количества оксалатдеградирующих бактерий на модели дисбиоза у крыс вызванного совместным введением ампициллина и метронидозола. **Методы.** Объектом исследования были изменения общего количества оксалатдеградирующей микробиоты фекального биоптата и пристеночной микробиоты толстой и тонкой кишок самцов крыс линии Wistar (вес 170–200 г, n=7). Коктейль ампициллина (75 мг/кг) с метронидозолом (50 мг/кг) вводили per os 1 раз в сутки, в течение 3 дней. Динамику изменений микробиоты оценивали сразу после отмены



введения антимикробных препаратов, на 18, 29 и 59 день от начала эксперимента. Микробиологический анализ фекального (КОЕ/г) и пристеночного (КОЕ/см<sup>2</sup>) биоптатов крыс осуществляли бактериологическим путем при посеве соответствующих разведений на селективные среды. Результаты представлены в виде  $M \pm m \lg \text{ КУО/г (см}^2\text{)}$ . **Результаты.** Количество бактерий, которые высевались с фекального биоптата на высоко селективной среде Oxalate Medium (5 г/л Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) снижалось на 29-й день эксперимента с  $6,22 \pm 0,20$  до  $4,37 \pm 0,80 \lg \text{ КОЕ/г}$  ( $P < 0,05$ ) и оставалась ниже показателей в соответствующей контрольной группе на 59-й день эксперимента. Достоверное снижение количества оксалатдеградирующей микробиоты (с  $7,05 \pm 0,35$  до  $5,13 \pm 0,05 \lg \text{ КОЕ/см}^2$ ,  $P < 0,05$ ) регистрировали в пристеночном биоптате толстой кишки на 59-й день эксперимента. Однако в пристеночном биоптате тонкой кишки их количество было в пределах контрольных значений. Количество анаэробных сахаролитических бактерий родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, которые способны метаболизировать оксалат, оставалось в пределах контрольных значений в фекальном и пристеночном биоптатах толстой и тонкой кишок в течение всего периода наблюдения после отмены антибиотиков. **Выводы.** При антибиотикоассоциированном дисбиозе происходит снижение общего количества оксалатдеградирующих бактерий, которое прогрессирует во времени и может стать причиной образования оксалатных конкрементов.

*Ключевые слова:* оксалат, оксалатдеградирующие бактерии, дисбиоз.

I. V. Akulenko<sup>1</sup>, M. Y. Korbush<sup>1</sup>, V. O. Stetska<sup>1</sup>,  
T. M. Serhiychuk<sup>1</sup>, G. M. Tolstanova<sup>1</sup>, N. M. Stepanova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv,  
64/13, Volodymyrska str., Kyiv, 01601, Ukraine, phone: +38 (044) 239 33 33

<sup>2</sup> State Institution "Institute of Nephrology NAMS of Ukraine",  
17-V, Dehtiarivska, Kyiv, 04050, Ukraine,  
phone: +38 (044) 225 93 77, e-mail: estee23@gmail.com

## EFFECT OF ANTIBIOTICOTHERAPY ON THE TOTAL AMOUNT OF OXALATE-DEGRADING BACTERIA IN THE RATS INTESTINAL TRACT

### Summary

**Aim.** To determine the quantity of oxalate-degrading bacteria (ODB) in fecal biopsy and mucosa-associated microbiota of the colon and small intestine of rats. **Methods.** Study was conducted on male Wistar rats (weight 170–200 g, n=7). The object of the study was the change in the total amount of oxalate-degrading microbiota of the fecal and mucosa-associated biotope of the colon and small intestine. The mix of ampicillin (75 mg/kg) and metronidazole (50 mg/kg) was injected once a day, for 3 days per os. The dynamics of microbiota changes were evaluated immediately after the antibiotics withdrawals, on the 18<sup>th</sup>, 29<sup>th</sup> and 59<sup>th</sup> days of the experiment. The microbiological analysis of fecal (CFU/g) and mucosa-associated (CFU/cm<sup>2</sup>) biotope of rats was carried out bacteriologically by sowing the according dilutions on elective media. The results are presented in the form of  $M \pm m \lg \text{ CFU/g (см}^2\text{)}$ . **Results.** The number of bacteria from the fecal biopsy sowed in a highly selective Oxalate Medium (5 g/l Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) decreased



from  $6,22 \pm 0,20$  to  $4,37 \pm 0,80$  lg CFU/g ( $P < 0,05$ ) at 29<sup>th</sup> day of experiment and remained below the values in the corresponding control group on the 59<sup>th</sup> day of the experiment. A significant decline in the amount of oxalate-degrading microbiota (from  $7,05 \pm 0,35$  to  $5,13 \pm 0,05$  lg CFU/cm<sup>2</sup>,  $P < 0,05$ ) was recorded in the mucosa-associated microbiota of the colon on the 59<sup>th</sup> day of the experiment. However, in the mucosa-associated microbiota of the small intestine, their number was within the control values. The number of anaerobic saccharolytic bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* remained within the control values in the fecal and mucosa-associated biotopes of the colon and small intestine after antibiotics treatment. **Conclusion.** Progressive decrease in the total number of oxalate-degrading bacteria during antibiotic-associated dysbiosis can become the cause of oxalate concretions formation.

*Key words:* oxalate, oxalate-degrading bacteria, dysbiosis.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Акуленко І. Залежність кількісного вмісту оксалатдеградувальних бактерій у фекальному біопаті щурів від кількості оксалатів у раціоні харчування / І. Акуленко, В. Стецька, Т. Сергійчук, Г. Толстанова, Н. Степанова // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2018. – 1(75). – С. 55–58.
2. Деркач И. А. Значение кишечника в развитии уролитиаза / И. А. Деркач // «Новости медицины и фармации» гастроэнтерология. – 2015. – 527. – С. 33–37.
3. Дорофеев А. Э. Заболевание кишечника и почки / А. Э. Дорофеев, Н. Н. Руденко, И. А. Деркач, Ю. В. Чечула // Гастроэнтерология. – 2015. – 3(57). – С. 101–105.
4. Сергійчук М. Г. Цитологія мікроорганізмів – методичні рекомендації до спецпрактикуму / М. Г. Сергійчук, Т. М. Фурзікова, О. С. Радченко, Л. Г. Степура // К. – Фітосоціоцентр. – 2000.
5. Abratt V. R. Oxalate-Degrading Bacteria of the Human Gut as Probiotics in the Management of Kidney Stone Disease / Abratt V.R, Reid S.J. // Advances in Applied Microbiology. – 2010. – 72. – P. 63–87.
6. Atlas R. M. Handbook of microbiological media 4th edition / R.M. Atlas // editor: Taylor and Francis Group, LLC. – 2010. – P. 1333–1334.
7. Cirillo M. Nephrolithiasis in patients with intestinal diseases / M. Cirillo, M. Iudici, F. Marcarelli, M. Laudato, F. Zincone // Italian Nefrology. – 2008. – 25(1). – P. 42–8.
8. Hatch M. Oxalobacter sp. reduces urinary oxalate excretion by promoting enteric oxalate secretion / M. Hatch, J. Cornelius, M. Allison, H. Sidhu, A. Peck, R.W. Freel // Kidney International – 2006. – 69. – P. 691–698.
9. Jakobsson H. E. Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome / H. E. Jakobsson, C. Jernberg, A. F. Andersson, M. Sjölund-Karlsson, J.K. Jansson, L. Engstrand // PLoS One. – 2010. – 5(3). – e9836.
10. Ermolenko E, Ggromova L, Borscev Y, Voeikova A, Karaseva A, Ermolenko K, Gruzdkov A, Suvorov A. Influence of Different Probiotic Lactic Acid Bacteria on Microbiota and Metabolism of Rats with Dysbiosis. Bioscience of



Microbiota, Food Health. 2013;32(2);41–49.

11. *Kirylyuk K.* Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens / K. Kirylyuk, Y. Li, F. Scolari et al. // *Nature Genetics*. – 2014. – 46(11). – P. 1187–96.

12. *Knight J.* The genetic composition of *Oxalobacter formigenes* and its relationship to colonization and calcium oxalate stone disease / J. Knight, R. Deora, D.G. Assimos, R.P. Holmes // *Urolithiasis*. – 2013. – 41(3). – P. 187–196.

13. *Lange J. N.* Sensitivity of human strains of *Oxalobacter formigenes* to commonly prescribed antibiotics / Lange J. N., K. D. Wood, H. Wong, R. Otto, P. W. Mufarrij, J. Knight, H. Akpinar, R. P. Holmes, D. G. Assimos // *Urology*. – 2012. – 79(6). – P. 1286–1289.

14. *Miller A. W.* The Gastrointestinal Tract of the White-Throated Woodrat (*Neotoma albigula*) Harbors Distinct Consortia of Oxalate-Degrading Bacteria / A.W. Miller, K.D. Kohl, M.D. Dearing // *Applied and environmental microbiology*. – 2014. – 80(5). – P. 1595–1601.

15. *Mogna L.* Screening of Different Probiotic Strains for Their In Vitro Ability to Metabolise Oxalates Any Prospective Use in Humans? / L. Mogna, M. Pane, S. Nicola, E. Raiteri // *Journal of Clinical Gastroenterology*. – 2014. – 48(1). – P. 91–95.

#### Referernces

1. Akulenko I, Stetska V, Serhiychuk T, Tolstanova G, Stepanova N. Dependence of quantitative composition oxalate-degrading bacteria in fecal biopsy of rats from quantity of oxalates in ration nutrition. *Visnyk of Taras Shevchenko national university of Kyiv. Biology*. 2018;1(75);55-58 (In Ukrainian).

2. Derkach I. The value of the intestine in the development of urolithiasis. «*Novosty medytsyny y farmatsyy*» *hastroenterolohyia*. 2008;25(1);42-8 (In Russian).

3. Dorofeev AE, Rudenko NN, Derkach IA, Chechula YuV. Zabolevanie kishchechnika i pochki. *Gastroenterologiya*. 2015;3(57);101-105.

4. Sergiychuk MG, Furzikova TM, Radchenko OS, Stepura LG. Cytology of microorganisms - methodical recommendations / MG. Sergiychuk, // K. – *Fitosotsiotsentr*. – 2000 (In Ukrainian).

5. Abratt VR, Reid SJ. Oxalate-Degrading Bacteria of the Human Gut as Probiotics in the Management of Kidney Stone Disease. *Advances in Applied Microbiology*. 2010;72;63–87.

6. Atlas RM. *Handbook of microbiological media* 4th edition. Editor: Taylor and Francis Group, LLC. 2010;1333-1334.

7. Cirillo M, Iudici M, Marcarelli F, Laudato M, Zincone F. Nephrolithiasis in patients with intestinal diseases. *Italian Nefrology*. 2008;25(1);42-8.

8. Hatch M, Cornelius J, Allison M, Sidhu H, Peck A, Freel RW. *Oxalobacter sp.* reduces urinary oxalate excretion by promoting enteric oxalate secretion. *Kidney International*. 2006;69;691–698.

9. Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjölund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L. Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLoS One*. 2010;5(3);e9836.



10. Ermolenko E, Ggromova L, Borsev Y, Voeikova A, Karaseva A, Ermolenko K, Gruzdkov A, Suvorov A. Influence of Different Probiotic Lactic Acid Bacteria on Microbiota and Metabolism of Rats with Dysbiosis. *Bioscience of Microbiota, Food Health*. 2013;32(2);41–49.

11. Kiryluk K, Li Y, Scolari F. et al. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nature Genetics*. 2014;46(11);1187–96.

12. Knight J, Deora R, Assimos DG, Holmes RP. The genetic composition of *Oxalobacter formigenes* and its relationship to colonization and calcium oxalate stone disease. *Urolithiasis*. 2013;41(3);187–196.

13. Lange JN, Wood KD, Wong H, Otto R, Mufarrij PW, Knight J, Akpınar H, Holmes RP, Assimos DG. Sensitivity of human strains of *Oxalobacter formigenes* to commonly prescribed antibiotics. *Urology*. 2012;79(6);1286–1289.

14. Miller AW, Kohl KD, Dearing MD. The Gastrointestinal Tract of the White-Throated Woodrat (*Neotoma albigula*) Harbors Distinct Consortia of Oxalate-Degrading Bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 2014;80(5); 1595–1601.

15. Mogna L, Pane M, Nicola S, Raiteri E. Screening of Different Probiotic Strains for Their In Vitro Ability to Metabolise Oxalates Any Prospective Use in Humans? *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2014;48(1);91–95.

Стаття надійшла до редакції 11.03.2019 р.



**І. В. Страшнова, Г. В. Ямборко, Н. Ю. Васильєва**

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

## **СТІЙКІСТЬ ШТАМІВ ЛАКТОБАЦИЛ, ВИДІЛЕНИХ З РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ, ДО ДЕЯКИХ АГРЕСИВНИХ ЧИННИКІВ ТРАВНОГО ТРАКТУ**

**Мета.** Дослідити стійкість бактерій роду *Lactobacillus* до деяких агресивних чинників шлунково-кишкового тракту *in vitro* в залежності від первинного джерела виділення. **Методи.** У роботі використано 13 штамів лактобацил, виділених з самоквасних овочів, м'ясної сировини, екскрементів дітей. Резистентність бактерій до метаболітів травної системи визначали шляхом їх культивування у середовищі MRS з жовчю, хлоридом натрію і фенолом. **Результати.** Переважна більшість лактобацил була толерантною до 2,5–5,0% NaCl. Збільшення концентрації NaCl до 7,5% призвело до зменшення кількості життєздатних клітин та інтенсивності їх росту. Показано, що найбільш стійкими до NaCl виявилися штами, ізольовані з самоквасних овочів. Присутність 20 і 40% жовчі у культуральному середовищі сповільнювало, але не гальмувало ріст лактобацил. Найбільш стійкими до дії жовчі виявилися штами, ізольовані з м'ясної сировини. Усі штами лактобацил росли у присутності фенолу в середовищі культивування в концентраціях 0,2–0,6%. **Висновки.** Досліджувані штами лактобацил показали варіабельну реакцію на дію хлориду натрію, солей жовчі і фенолу, яка залежала від специфічності штаму та концентрації активної речовини. Показано, що існує часткова залежність між стійкістю до досліджених чинників і джерелом виділення лактобацил.

*Ключові слова:* лактобацили, хлорид натрію, жовч, фенол.

Представники молочнокислих бактерій серед усіх пробіотичних мікроорганізмів користуються найбільшим попитом. Це зумовлено притаманними їм корисними властивостями, таким як стійкість до природних інгібіторів травного тракту, адгезивна й антагоністична активності, природна резистентність до сучасних антибактеріальних препаратів, здатність синтезувати корисні для людини біологічно активні речовини (ферменти, вітаміни, органічні кислоти тощо), стимулювати імунну відповідь [2, 3, 15, 16]. Пробіотичні штами мікроорганізмів використовуються у складі препаратів та продуктів функціонального харчування. Незважаючи на досить тривале їх застосування, проводяться дослідження щодо пошуку, виділення і вдосконалення пробіотичних бактерій [8, 12, 15].

Це, з одного боку, зумовлено зростанням популярності пробіотиків на тлі проблем, викликаних широкомасштабним використанням антибіотиків і



стрімким накопиченням полірезистентних до антибіотиків форм бактерій: на відміну від антибіотиків, пробіотики забезпечують замісну терапію і профілактику захворювань, конкуруючи в шлунково-кишковому тракті з патогенною мікробіотою. З іншого боку, стало відомо, що має місце специфічність в адгезії певних бактерій до поверхні клітин ворсинок кишечника певного господаря, що зумовлює необхідність пошуку бактерій, які найбільш ефективно колонізують слизову шлунково-кишкового тракту того чи іншого господаря [3, 6, 8]. Але значна частина клітин пробіотичних штамів мікроорганізмів втрачає свою активність та/або гине, проходячи по травному тракту і зазнаючи впливу рН, соляної кислоти, жовчі, фенолу, пепсину тощо [1, 15].

Використання лактобацил як пробіотичних штамів висуває ряд вимог до цієї групи мікроорганізмів, пов'язаних з їх здатністю виживати в умовах підвищеної кислотності, солоності, присутності ферментів шлунково-кишкового тракту.

Крім того, вони відіграють роль в боротьбі з інтоксикацією та інфекцією, виступаючи в ролі антагоністів проти інших патогенів за допомогою виробництва антибіотиків і бактеріоцинів [4, 7].

Метою роботи було дослідити стійкість бактерій роду *Lactobacillus* до деяких агресивних чинників шлунково-кишкового тракту *in vitro* в залежності від первинного джерела виділення.

### **Матеріали та методи**

Об'єктами дослідження були 13 штамів бактерій роду *Lactobacillus*. Шість штамів (*Lactobacillus sp.* B1, B3, B4, B5, B6, O1) ізольовані із самоквасних овочів; чотири (*Lactobacillus sp.* M1, M2, M3, M6) з м'ясної сировини; три (*Lactobacillus sp.* 146, 275, 175) із екскрементів дітей.

Стійкість до секретів макроорганізму, що впливають на лактобацили при їх транзиті через шлунково-кишковий тракт, досліджували *in vitro*, використовуючи різні концентрації NaCl (2,5%–7,5%), жовчі (20%–40%) та фенолу (0,2%–0,6%) [11].

Нічну культуру штамів *Lactobacillus* вирощували аеробно в термостаті протягом 24 годин при 37 °C в рідкому середовищі MRS.

Хлорид натрію, жовч і фенол у відповідних концентраціях додавали до рідкого живильного середовища MRS. Попередньо готували добові культури лактобацил у рідкому живильному середовищі MRS. Після чого по 0,2 см<sup>3</sup> вносили у кожну пробірку з варіантом експериментального середовища. Контролем були добові культури лактобацил у рідкому середовищі MRS. Бактерії вирощували при температурі 37 °C впродовж 24 годин [5].

Статистичне опрацювання результатів здійснювали за допомогою програми Calck (розрахунок середнього значення, похибки і дисперсії) та програми R 3.6.0 (дисперсійний і кластерний аналіз, оцінювання непараметричних критеріїв) з використанням методів дисперсійного та кластерного аналізів [9].

### **Результати досліджень та їх обговорення**

Пробіотичні бактерії повинні виживати в умовах шлунково-кишкового тракту. Тому *in vitro* досліджено здатність штамів лактобацил виживати при



різних значеннях NaCl, жовчі, фенолу. Отримані в цьому дослідженні результати підтвердили наше припущення про те, що в агресивному середовищі, молочнокислі бактерії зазнають стресу, що позначається на їх життєздатності та виживанні.

Для того, щоб простежити вплив джерела виділення на формування пробіотичних властивостей молочнокислих бактерій, усі досліджені штами лактобацил розглядали як сукупність з трьох незалежних вибірок. До першої вибірки були віднесені штами, ізольовані з овочів, до другої – штами з м'ясної сировини, до третьої – штами, ізольовані з екскрементів дітей.

Перевірка селективної ознаки – стійкості до підвищеної концентрації NaCl – зумовлена тим, що хлорид натрію необхідний для утворення соляної кислоти, яка є складовою частиною шлункового соку.

Крім того, використання лактобацил в технології приготування продуктів харчування також передбачає використання як першооснови штамів, які стійкі до дії цієї солі. Як показано багатьма дослідниками вплив високих концентрацій має не просто пригнічувальну дію на ріст і питому швидкість представників роду *Lactobacillus*, а й пригнічує продукування бактеріоцинів [1, 14, 16].

Незалежно від первинного джерела виділення в присутності 2,5 % NaCl усі досліджені штами лактобацил продемонстрували ріст на рівні з контролем, а достовірного розходження у показниках стійкості між штамами в досліді та контролі не визначено (рис. 1).

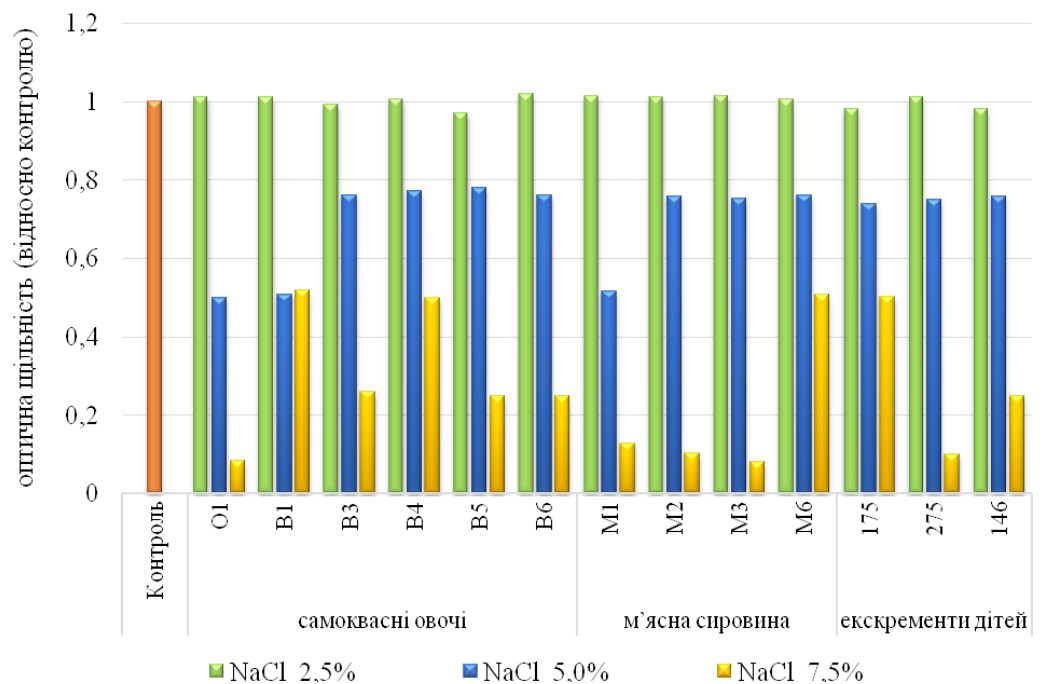


Рис. 1. Стійкість досліджених штамів *Lactobacillus sp.* до хлориду натрію (показники відносно контролю)

Fig. 1. Stability of the studied *Lactobacillus sp.* strains to sodium chloride (indicators relative to control)





Слід відмітити, що у даному випадку відгук штамів на вплив хлориду натрію був однотипним, незалежно від вибірки, що підтверджується критерієм Краскела-Уолліса (KW), який є непараметричним аналогом однофакторного дисперсійного аналізу для порівняння незалежних груп [4, 13] (табл. 1).

Таблиця 1

**Порівняння показників стійкості досліджених штамів до різних концентрацій NaCl за критеріями Краскела-Уолліса і Уїлкоксона**

Table 1

**Comparison of the resistance indicators of the studied strains to various NaCl concentrations according to the Kruskal-Wallis and Wilcoxon criteria**

Джерело виділення	Показник	Критерій Краскела-Уолліса	Критерій Уїлкоксона		
			NaCl 2,5%	NaCl 5,0%	NaCl 7,5%
Самоквасні овочі	NaCl 2,5%	KW =1,70, p=0,8887	W = 18,0, p = 1,0	W = 36,0, p = 0,002	W = 36,0, p = 0,002
	NaCl 5,0%	KW =19,71, p=0,0014		W = 18,0, p = 1,000	W = 33,5, p = 0,002
	NaCl 7,5%	KW =24,59, p=0,0003			W = 18,0, p = 1,000
М'ясна сировина	NaCl 2,5%	KW =0,60, p=0,8964	W = 8,0, p = 1,0	W = 16,0, p = 0,028	W = 16,0, p = 0,028
	NaCl 5,0%	KW =13,20, p=0,0042		W = 8,0, p = 1,000	W = 16,0, p = 0,025
	NaCl 7,5%	KW =20,68, p=0,0001			W = 8,0, p = 1,000
Екскременти дітей	NaCl 2,5%	KW =0,95, p=0,6215	W = 4,5, p = 1,0	W = 9,0, p = 0,028	W = 9,0, p = 0,028
	NaCl 5,0%	KW =0,74, p=0,6878		W = 4,5, p = 1,000	W = 9,0, p = 0,025
	NaCl 7,5%	KW =15,15, p=0,0005			W = 4,5, p = 1,000

З підвищенням концентрації NaCl до 5,0% було відзначено, що відгук штамів стає неоднорідним для вибірок «самоквасні овочі» та «м'ясна сировина». Отримані розрахункові значення критеріїв Краскела-Уолліса дорівнюють 19,71 і 13,20 при рівні значущості  $p=0,0014$  і  $p=0,0042$ , що свідчить про прийняття нульової гіпотези.

Для штамів, ізольованих з екскрементів дітей, за впливу NaCl у концентрації 5,0% показники критерію Краскела-Уолліса свідчать про однорідність відгуку. Ще більш яскраво виражена неоднорідність реакції досліджених штамів на 7,5% NaCl у середовищі культивування. В даному випадку в кожній дослідженій вибірці реєстрували значне розходження у показниках оптичної щільності культуральної рідини. Достовірність відмінності між показниками оптичної щільності в залежності від концентрації NaCl підтверджена критерієм Уїлксона (табл. 1).



Серед максимально стійких штамів присутні як ізольовані з самоквасних овочів (*Lactobacillus sp.* B4 і B1), м'ясної сировини (*Lactobacillus sp.* M6, так і з екскрементів дітей (*Lactobacillus sp.* 175). Найменш стійкими по відношенню до всіх досліджуваних концентрацій натрію хлориду були штами *Lactobacillus sp.* 275 (екскременти дітей), *Lactobacillus sp.* M1, M2, M3 (м'ясна сировина) і *Lactobacillus sp.* O1 (самоквасні овочі).

Проведений кластерний аналіз графічно підтвердив попереднє угруповання штамів (рис. 2).

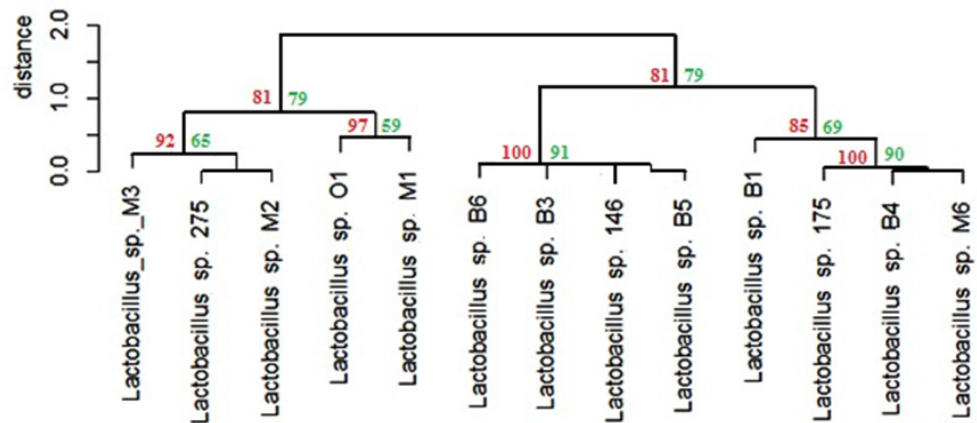


Рис. 2. Дендрограма результатів кластеризації показників стійкості досліджених штамів до NaCl (кластеризація даних з використанням функції pvclust при nboot = 1000 (матриця відстаней - method "canberra", спосіб агрегування - method "complete")

Fig. 2. Dendrogram of clustering results of the resistance indicators of the studied strains to NaCl (clustering was carried out with the pvclust function at nboot = 1000 (distance matrix - method "canberra", aggregation method - method "complete")

Усі штами, що були відзначені як стійкі до дії NaCl (*Lactobacillus sp.* B4, M6, 175 та B1), віднесені до одного кластеру. Аналогічно, штами з мінімальною стійкістю до NaCl (*Lactobacillus spp.* M3, 275, M2, O1, M1) були згруповані в інший кластер.

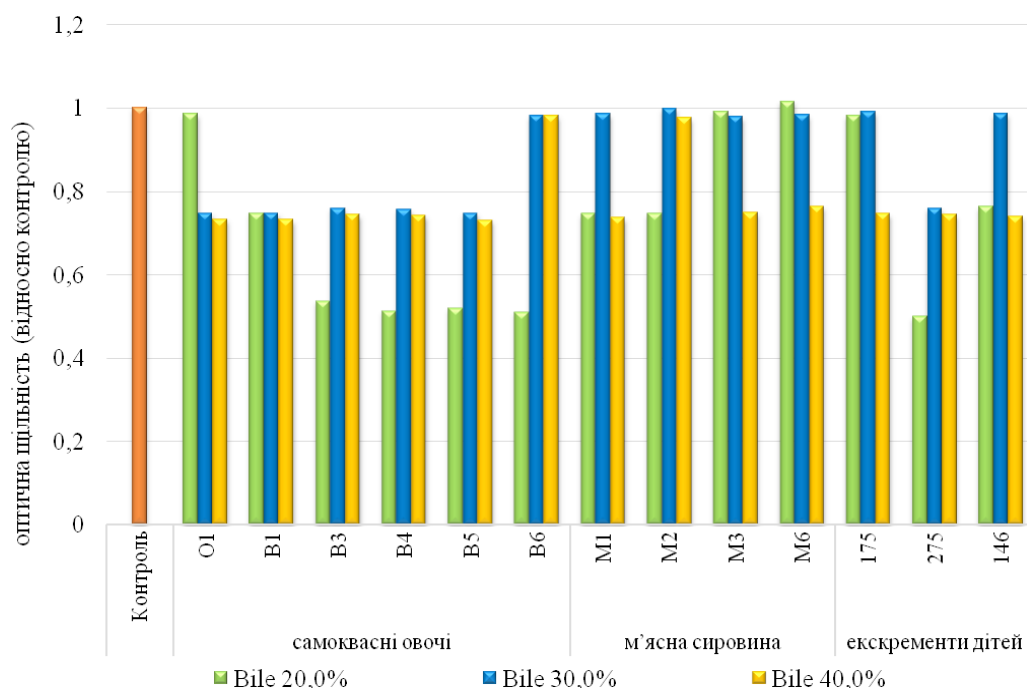
Незважаючи на те, що найстійкіші штами були ізольовані з різних джерел, усереднені для усіх штамів за вибірками показники оптичної щільності свідчать про те, що найбільш стійкими виявилися штами лактобацил, ізольовані з самоквасних овочів. Однак, в середньому відсоток стійких штамів у кожній вибірці по відношенню до максимальної концентрації хлориду натрію був однаковим – 33,3%. Таким чином, не можна стверджувати, що первинне джерело виділення штамів впливає на остаточну стійкість до NaCl.

Стійкість до жовчі є однією із важливих ознак мікроорганізмів, що входять до складу пробіотиків, оскільки солі жовчі руйнують ліпіди і жирні кислоти клітинних мембран бактерій. Більшість штамів проявили високу життєздатність за наявності у середовищі жовчі у всіх досліджуваних концентраціях. Наявність даного агресивного агента сповільнювала, але не пригні-



чувала ріст лактобактерій.

Досить цікавим виявилось, що майже усі досліджені штами були стійкими до жовчі у концентрації 30 % (рис. 3).



**Рис. 3.** Стійкість досліджених штамів *Lactobacillus sp.* до різних концентрацій жовчі (показники відносно контролю)

**Fig. 3.** Resistance of the studied strains *Lactobacillus sp.* to various concentrations of bile (indicators relative to control)

Найстійкішими до усіх концентрацій жовчі виявилися штами *Lactobacillus sp.* 175 (екскременти дітей), *Lactobacillus sp.* M2, M3 і M6 (м'ясна сировина).

Згідно визначеним критеріям Уїлкоксона, немає достовірної різниці між показниками росту досліджених штамів лактобацил, ізольованих з самоквасних овочів, у живильному середовищі з 30% і 40% жовчі. Так само не спостерігали різниці у ростових показниках досліджених штамів, ізольованих з м'ясної сировини, за усіх дослідних концентрацій жовчі (табл. 2).

Проведений однофакторний дисперсійний аналіз із застосуванням критерію Краскела-Уолліса показав неоднорідність відгуку досліджених штамів лактобацил до дії 20% жовчі незалежно від первинного джерела виділення (табл. 2).

Однак, для концентрацій жовчі 30% і 40% було показано, що штами ізольовані з м'ясної сировини та екскрементів дітей реагують більш ідентично. Достовірність прийняття нульової гіпотези підтверджено показниками критерію Уїлкоксона ( $KW=1,125$ , при  $p=0,770$  і  $KW=0,322$ , при  $p=0,8512$ ).

Взагалі саме штами, ізольовані з м'ясної сировини, демонстрували мак-

симальні показники оптичної щільності, тобто росту, при концентрації жовчі 30% (рис. 3).

Таблиця 2

Порівняння показників стійкості досліджених штамів до різних концентрацій жовчі за критеріями Краскела-Уолліса і Уїлкоксона

Table 2

Comparison of the resistance indicators of the studied strains to various concentrations of bile according to the Kruskal-Wallis and Wilcoxon criteria

Джерело виділення	Показник	Критерій Краскела-Уолліса	Критерій Уїлкоксона		
			жовч 20,0%	жовч 30,0%	жовч 40,0%
Самоквасні овочі	жовч 20%	KW =21,07, p=0,0007	W = 18,0, p = 1,0	W = 7,0, p = 0,087	W = 10,0, p = 0,224
	жовч 30%	KW =12,88, p=0,01244		W = 18,0, p = 1,000	W = 9,0, p = 0,884
	жовч 40%	KW =12,89, p=0,0244			W = 18,0, p = 1,000
М'ясна сировина	жовч 20%	KW =14,48, p=0,0023	W = 8,0, p = 1,0	W = 6,5, p = 0,768	W = 9,0, p = 0,882
	жовч 30%	KW =1,13, p=0,7700		W = 8,0, p = 1,000	W = 11,0, p = 0,541
	жовч 40%	KW =11,44, p=0,0095			W = 8,0, p = 1,000
Екскременти дітей	жовч 20%	KW =12,50, p=0,0019	W = 4,5, p = 1,0	W =2,5, p = 0,306	W = 6,0, p = 0,760
	жовч 30%	KW =9,47, p=0,0087		W = 4,5, p = 1,000	W = 9,0, p = 0,100
	жовч 40%	KW =0,32, p=0,8512			W = 4,5, p = 1,000

На відміну від дослідження стійкості лактобацил до хлориду натрію, коли джерело виділення майже не впливало на рівень стійкості бактерій, при дослідженні стійкості цих штамів до жовчі була виявлена певна залежність. Найбільш стійкими до дії жовчі були штами, ізольовані з м'ясної сировини (*Lactobacillus sp.* M2, M2, M6), а найменш стійкими – з самоквасних овочів (*Lactobacillus sp.* B3, B4, B5).

У процесі бродіння у кишківнику утворюються індол, скатол, фенол, які пригнічують ріст і розвиток корисної мікробіоти. Встановлено, що лише стійкі до фенолу (0,4–0,5%) штами лактобактерій здатні прижитися в шлунково-кишковому тракті [9, 17].

Як і в попередніх дослідженнях щодо визначення стійкості лактобацил до хлориду натрію і жовчі, спостерігали тенденцію зменшення показника життєздатних клітин бактерій з підвищенням концентрації дослідженого агресивного чинника. За наявності у середовищі культивування фенолу у концентраціях 0,2–0,6% усі штами росли, але інтенсивність росту, яка зале-



жить від кількості життєздатних клітин, зменшувалася із збільшенням концентрації цього агенту (рис. 4).

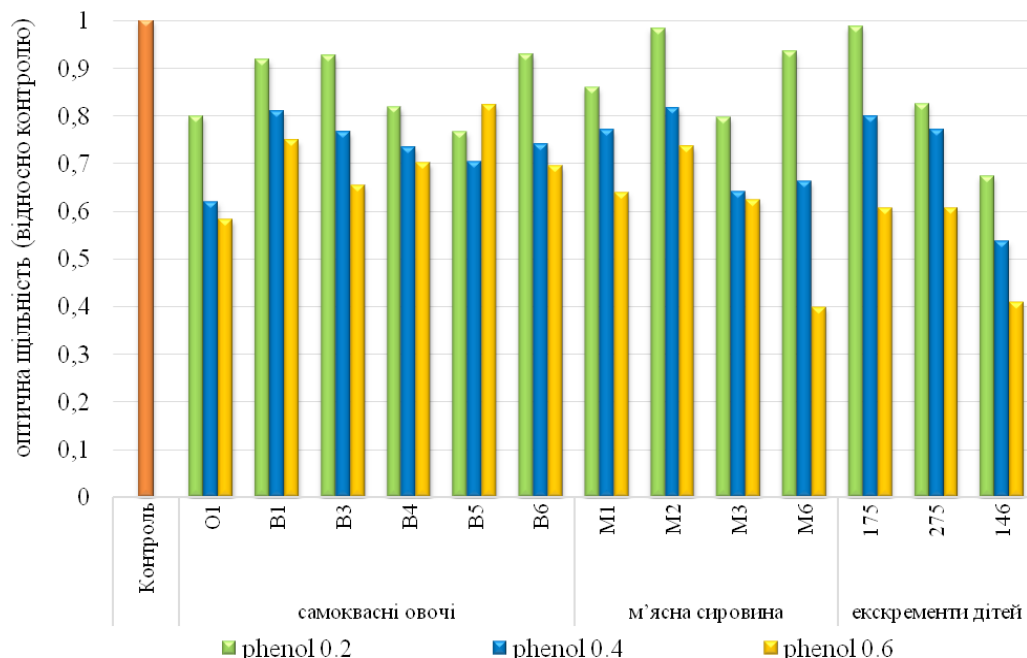


Рис. 4. Стійкість досліджених штамів *Lactobacillus sp.* до фенолу (показники відносно контролю)

Fig. 4. Resistance of the studied strains *Lactobacillus sp.* to various concentrations of phenol (indicators relative to control)

Винятком був штам *Lactobacillus sp.* M5 (з м'ясної сировини), для якого реєстрували збільшення показника оптичної щільності зі збільшенням концентрації фенолу.

Найчутливішими до дії фенолу у концентрації 0,4 % виявилися штами *Lactobacillus sp.* 146, O1 та M3, найстійкішими – штами *Lactobacillus sp.* 175, B1 і M2. Найчутливішими до дії фенолу у концентрації 0,6% виявилися штами *Lactobacillus sp.* 146, M6 і O1, найстійкішими – штами *Lactobacillus sp.* B1 і B5.

При дослідженні стійкості штамів лактобацил до фенолу не було зареєстровано однорідності відгуку, що підтверджується критеріями Краске-ла-Уолліса і Уїлкоксона (табл. 3).

При аналізі залежності стійкості до фенолу показано, що штами лактобацил ізольованих з самоквасних овочів були найбільш стійкими за усередненими показниками оптичної щільності, однак доказів впливу первинного джерела виділення на формування стійкості до фенолів не виявлено.

Експериментально встановлено і статистично підтверджено, що досліджені штами лактобацил проявили варіабельну реакцію на дію хлориду натрію, солей жовчі і фенолу, яка визначалася конкретним штамом і концентрацією діючої речовини. Було показано, що джерело виділення частково впливає на

Таблиця 3

**Порівняння показників стійкості досліджених штамів до різних концентрацій фенолу за критеріями Краскела-Уолліса і Уїлкоксона**

Table 3

**Comparison of the resistance indicators of the studied strains to various concentrations of phenol according to the Kruskal-Wallis and Wilcoxon criteria**

Джерело виділення	Показник	Критерій Краскела-Уолліса	Критерій Уїлкоксона		
			фенол 0,2%	фенол 0,4%	фенол 0,6%
Самоквасні овочі	фенол 0,2%	KW =16,06, p=0,0134	W = 18,0, p = 1,0	W = 33,5, p = 0,015	W = 33,5, p = 0,015
	фенол 0,4%	KW =15,28, p=0,0181		W = 18,0, p = 1,000	W = 22,5, p = 0,521
	фенол 0,6%	KW =19,15, p=0,0039			W = 18,0, p = 1,000
М'ясна сировина	фенол 0,2%	KW =9,94, p=0,0190	W = 8,0, p = 1,0	W = 15,0, p = 0,057	W = 16,0, p = 0,028
	фенол 0,4%	KW =13,09, p=0,0044		W = 8,0, p = 1,000	W = 13,5, p = 0,146
	фенол 0,6%	KW =15,17, p=0,0016			W = 8,0, p = 1,000
Екскременти дітей	фенол 0,2%	KW =11,52, p=0,0031	W = 4,5, p = 1,0	W =6,0, p = 0,100	W = 9,0, p = 0,076
	фенол 0,4%	KW =9,78, p=0,0075		W = 4,5, p = 1,000	W = 9,0, p = 0,076
	фенол 0,6%	KW =9,45, p=0,0088			W = 4,5, p = 1,000

формування стійкості штамів лактобацил до агресивних чинників шлунково-кишкового тракту. Показано, що штами, ізольовані з самоквасних овочів, більш стійкі до дії хлориду натрію, а штами, ізольовані з м'ясної сировини, більш стійкі до дії жовчі. Не виявлено впливу первинного джерела виділення на формування стійкості досліджених лактобацил до фенолу. Взагалі було показано, що не зважаючи на вказану залежність, всередині кожної виборки існує неоднорідність відгуку штамів на дію чинника, що підтверджує варіабельність штамів молочнокислих бактерій.



**И. В. Страшнова, А. В. Ямборко, Н. Ю. Васильева**

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

## **УСТОЙЧИВОСТЬ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ, К НЕКОТОРЫМ АГРЕССИВНЫМ ФАКТОРАМ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА**

### **Реферат**

**Цель.** Исследовать устойчивость бактерий рода *Lactobacillus* к некоторым агрессивным факторам желудочно-кишечного тракта *in vitro* в зависимости от первичного источника выделения. **Методы.** В работе использованы 13 штаммов лактобацилл, выделенных из самоквасных овощей, мясного сырья, экскрементов детей. Резистентность бактерий к метаболитов пищеварительной системы определяли путем их культивирования в среде MRS с желчью, хлоридом натрия и фенолом. **Результаты.** Подавляющее большинство лактобацилл были толерантными к 2,5–5,0% NaCl. Увеличение концентрации NaCl до 7,5% привело к уменьшению количества жизнеспособных клеток и интенсивности их роста. Было показано, что наиболее устойчивыми к NaCl оказались штаммы, изолированные из самоквасных овощей. Присутствие 20 и 40% желчи в культуральной среде замедляло, но не тормозило рост лактобацилл. Наиболее устойчивыми к действию желчи оказались штаммы, изолированные из мясного сырья. Все штаммы лактобацилл росли в присутствии фенола в среде культивирования в концентрации 0,2–0,6%, но было показано, что при повышении концентрации фенола, показатели оптической плотности значительно уменьшались. **Выводы.** Исследуемые штаммы лактобацилл показали вариабельность реакции на действие хлорида натрия, солей желчи и фенола, которая зависела от специфики штамма и концентрации активного вещества. Было показано, что существует частичная зависимость между устойчивостью к исследованным факторам и источником выделения лактобацилл.

*Ключевые слова:* лактобациллы, хлорид натрия, желчь, фенол.

**I. V. Strashnova, G. V. Yamborko, N. Yu. Vasylieva**

Odesa National I. I. Mechnykov University,  
2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine,  
e-mail: jamborkoann@ukr.net

## **RESISTANCE OF LACTOBACILLI STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT SOURCE TO SOME AGGRESSIVE FACTORS OF THE DIGITAL TRACT**

### **Summary**

**Aim.** To study the resistance of lactobacilli strains to some aggressive factors of gastrointestinal tract *in vitro* depending on the primary isolation source. **Methods.** 13 lactobacilli strains isolated from self-fermenting vegetables, meat raw



materials, children excrements were used in this work. The stability of bacteria to metabolites of the digestive system was determined by their cultivation in the MRS medium with bile, sodium chloride and phenol. **Results.** The vast majority of lactobacilli was tolerant at 2.5–5.0% NaCl. The increasing NaCl concentration to 7.5% has resulted in decrease of the viable cells number and its growth intensity. It was shown that the strains isolated from self-fermenting vegetables were the most resistant to NaCl. The presence of 20 and 40 % bile in the cultural medium slowed but did not inhibit the lactobacilli growth. The most resistant to bile were the strains isolated from raw meat. All lactobacilli strains grew in the presence of phenol in cultivation medium at concentrations of 0.2–0.6%, but it was shown that with increasing of phenol concentration, the optical density was significantly reduced. **Conclusion.** Investigated lactobacilli strains showed a variable reaction to the action of sodium chloride, salts of bile and phenol, which was determined by the specific strain and the concentration of the active substance. It has been shown that there is the partial relationship between resistance to the investigated factors and the source of lactobacilli isolation.

*Key words:* lactobacilli, sodium chloride, bile, phenol.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Даниленко С. Г. Дослідження впливу різних факторів на життєздатність молочнокислих бактерій // Продовольчі ресурси. Серія: Технічні науки. – 2014. – № 3. – С. 130–134.
2. Китаевская С. В. Современные тенденции отбора и идентификации пробиотических штаммов молочнокислых бактерий // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т.15, № 17. – С. 184–188.
3. Кушугулова А. Р., Садуахасова С. А., Синявский Ю. А., Каламкарова Л. И. и др. Скрининг представителей нормофлоры желудочно-кишечного тракта по пробиотической активности // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2013. – № 2 (58). – С. 122–128.
4. Медик В. А., Токмачев М. С. Математическая статистика в медицине : учеб. пособие. М. : Финансы и статистика, 2007. – 800 с.
5. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений. – М.: Академия, 2005. – С. 467–478.
6. Рамонова Э. В. Выделение и идентификация местных штаммов молочнокислых микроорганизмов и их использование в качестве пробиотиков: Автореф. дисс... канд. биол. наук. – Владикавказ, 2011. – 19 с.
7. Ромакин В. В. Комп'ютерний аналіз даних. К.: МДГУ ім. Петра Могили, 2006. – 150 с.
8. Ржевская В. С., Отурина И. П., Теплицкая Л. М. Изучение биологических свойств штаммов молочнокислых бактерий // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – 2014. – Т. 27, № 1 – С. 145–160.
9. Сиделев С. И. Математические методы в биологии и экологии: введение в элементарную биометрию: Учебное пособие. – Ярославль: ЯрГУ, 2012. 140 с.
10. Соловьева И. В., Точилина А. Г., Новикова Н. А., Белова И. В. и др.





Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus* // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. – № 2 (2). С. 462–468.

11. Фабіянська І. В. Розробка технології препаратів лактобацил і їх використання для виготовлення сировокопчених ковбас: Автореф. дис... канд. техн. наук. – Одеса, 2008. – 21 с.

12. Федорова О. В. Юнусова З. С. Шурбина М. Ю. Валеева Р. Т. Пробиотические препараты: характеристика, критерии, требования к ним // Вестник технологического университета. – 2016. – Т. 19, № 7. – С. 142–145.

13. Унгуряну Т. Н., Гржибовский А. М. Сравнение трех и более независимых групп с использованием непараметрического критерия Краскела – Уоллиса в программе STATA // Экология человека. – 2016. – № 6. С. 55–58.

14. Gandhi A., Shah N. P. Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* as observed by flow cytometry // Food Microbiology. – 2015. – Vol. 49. – P. 197–202.

15. Giraffa G., Chanishvili N., Widyastuti Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology // Res Microbiol. – 2010. – V. 161, N 6. – P. 480–487.

16. Neysens P., Messens W., De Vuyst L. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 // International Journal of Food Microbiology. – 2003. – Vol. 88. – P. 29–39.

17. Saarela M., Morgensen G., Fondén R., Mättö J., Mat-tila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties // Journal of Biotechnology. – 2000. – Vol. 84. – P. 197–215.

18. Succi M., Tremonte P., Reale A., Sorrentino E. et al. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese // FEMS Microbiology Letters. – 2005. – V. 244 (1). – P. 129–137.

## References

1. Danilenko SG. Investigation of the influence of various factors on the viability of lactic acid bacteria. Food resources. Series: Technical Sciences. 2014; 3: 130 -134 (In Ukrainian).

2. Kitaevskaya SV. Current trends in the selection and identification of probiotic strains of lactic acid bacteria. Bulletin of Kazan Technological University. 2012; 15 (17):184 – 188 (In Russian).

3. Kushugulova AR, Saduahasova SA, Sinyavsky YuA, Kalamkarova LI. et al. Screening of representatives of the normoflora of the gastrointestinal tract by probiotic activity. Vestnik KazNU. Biological Series. 2013; 2 (58):122- 128 (In Russian).

4. Medic VA, Tokmachev MS. Mathematical statistics in medicine: textbook. allowance. Moscow: Finance and Statistics. 2007. 800 (In Russian).

5. Netrusov AI, Egorova MA, Zakharchuk LM. Workshop on Microbiology: a manual for students of higher institutions. Moscow: Academy. 2005. 467 – 478 (In Russian).

6. Ramonova EV. Isolation and identification of local strains of lactic acid microorganisms and their use as probiotics. Abstract. diss ... cand. biol. sciences.



Vladikavkaz. 2011. 19 (In Russian).

7. Romakin VV. Computer analysis of data. Kyev: Petr Mogila MSU. 2006. 150 (In Ukrainian).

8. Rzhetskaya VS, Oturina IP, Teplitskaya LM. The study of the biological properties of lactic acid bacteria strains. Scientific notes of V.I. Vernadsky Tavricheskiy National University. 2014; 27 (1):145 – 160 (In Russian).

9. Sidelev SI. Mathematical methods in biology and ecology: introduction to elementary biometrics: Textbook. Yaroslavl: Yaroslavl State University, 2012. 140 (In Russian).

10. Solovyova IV, Tochilina AG, Novikova NA, Belova IV et al. Study of the biological properties of new strains of the genus *Lactobacillus*. Bulletin of N. I. Lobachevsky Nizhny Novgorod University. 2010; 2 (2): 462 – 468 (In Russian).

11. Fabianskaya IV. Development of technology of lactobacilli preparations and their use for the production of smoked sausages. Abstract. diss ... cand. tech. sciences. Odesa. 2011. 21 (In Ukrainian).

12. Fedorova OV, Yunusova ZS, Shurbina Myu, Valeeva RT. Probiotic preparations: characteristics, criteria, requirements for them. Bulletin of the Technological University. 2016; 19 (7): 142 – 145 (In Russian).

13. Unguryanu TN, Grzhibovsky AM. Comparison of three or more independent groups using the non-parametric Kruskal-Wallis test in the STATA program. Human ecology. 2016; 6: 55–58 (In Russian).

14. Gandhi A, Shah NP. Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* as observed by flow cytometry. Food Microbiology. 2015; 49: 197– 202.

15. Giraffa G, Chanishvili N, Widyastuti Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. Res Microbiol. 2010; 161 (6); 480 – 487.

16. Neysens P, Messens W, De Vuyst L. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. International Journal of Food Microbiology. 2003; 88: 29–39.

17. Saarela M, Morgensen G, Fondén R. Mättö J, Mat-tila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology. 2000;84: 197–215.

18. Succi M, Tremonte P, Reale A, Sorrentino E et al. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. FEMS Microbiology Letters. 2005; 244 (1): 129 – 137.

Стаття надійшла до редакції 11.07.2019 р.



Д. Р. Абдулина<sup>1</sup>, Ж. П. Коптева<sup>1</sup>, А. Е. Коптева<sup>1</sup>,  
М. Я. Вортман<sup>2</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины,  
Харьковское шоссе, 48, 02160, Киев, Украина

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ И РЕЗИНОТЕХНИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ НА УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ

Полимерные материалы широко используют в строительстве и разных отраслях промышленности, в связи с чем их устойчивость к микробной деградации привлекает внимание исследователей. **Цель.** Определение влияния пенополиэтилена, этиленвинилацетата и резины углеводородокисляющие бактерии *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102, *Bacillus subtilis* 138, выделенные из поврежденных защитных покрытий газопроводов. **Методы.** Изменение химического состава исследуемых материалов изучали методом инфракрасной Фурье-спектроскопии. Спектры регистрировали методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) на приставке ATR в спектральной области 400–4500 см<sup>-1</sup> на спектрофотометре «TENSOR-37» (Bruker Optik, Германия). Количество клеток бактерий определяли методом предельных разведений; коэффициент деградации – гравиметрически по потере веса образцов; ферментативную активность – спектрофотометрически на приборе КФК-3; изменения в компонентном составе материалов инфракрасной Фурье-спектроскопии на приборе TENSOR-37. **Результаты.** Показано, что в присутствии исследованных материалов как единственных источников углерода каталазная активность понижалась у *P. pseudoalcaligenes* 109, *R. erythropolis* 102 в 1,5–3,2 и 2,8–3,9 раза, соответственно, а у *B. subtilis* 138 – повышалась в 1,4–2,5 раза, по сравнению с контролем. Липазная активность *B. subtilis* 138 и *R. erythropolis* 102 в присутствии испытуемых материалов снижалась в 1,2–3,8 раза. Изучение компонентного состава полимерных и резинотехнических материалов после воздействия бактерий (методом инфракрасной спектроскопии) показало, что происходило разрушение функциональных карбонильных и эфирных связей. За 90 суток экспозиции коэффициент биодеструкции резины составил 0,4–0,6% (потеря по массе 10±0,9 и 16,6±2,6 мг в зависимости от культуры бактерий); пенополиэтилена и этиленвинилацетата был незначительный – 0,1% (потеря массы не превышала 0,9±0,01 мг). **Выводы.** Присутствие в среде пенополиэтилена, этиленвинилацетата, резины, как единственных источников углерода и энергии, способствовало понижению каталазной активности у *R. erythropolis* 102 и *P. pseudoalcaligenes* 109 и липазной активности у *R. erythropolis* 102 и *B. subtilis* 138.



*Ключевые слова: биостойкость, углеводородокисляющие бактерии, полимерные и резинотехнические материалы, ферментативная активность, инфракрасные спектры.*

Одной из причин снижения защитных свойств изоляционных материалов является жизнедеятельность микроорганизмов, способных инициировать или стимулировать деструкционные процессы. Микробное сообщество с разнообразными трофическими и физиологическими функциями, поселившись на материале, способствует его деградации [2, 6, 13]. Как известно, деградация защитных материалов – результат взаимодействия бактерий-деструкторов и разрушаемого материала. Микроорганизмы действуют на изоляционные покрытия продуктами своего метаболизма, в частности органическими и неорганическими кислотами, а также ферментами [5].

На сегодня в литературе встречаются единичные сведения о ферментативной активности бактерий-деструкторов защитных материалов. Приводятся данные, в основном, об активности окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов у микромицетов, повреждающих строительные материалы, пенопласты, резину и прочее. Однако, липолитическая и каталазная активности бактерий остаются малоизученными. В результате действия указанных выше групп ферментов происходит микробная деструкция материалов, уменьшается их прочность и эластичность. [6, 10].

Целью данной работы было определение влияния пенополиэтилена, этиленвинилацетата и резины на углеводородокисляющие бактерии *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102, *Bacillus subtilis* 138, выделенные из поврежденных защитных покрытий газопроводов. Эти материалы используют в разных отраслях промышленности, особенно в строительстве, благодаря высоким тепло- и звукоизоляционным качествам, прочностным свойствам и относительно невысокой стоимости.

### **Материалы и методы исследования**

Объектом исследования был процесс микробной деструкции полимерных и резинотехнических материалов. В качестве тест-культур использованы углеводородокисляющие бактерии *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102, *Bacillus subtilis* 138, выделенные и идентифицированные нами ранее из поврежденных защитных покрытий газопроводов [6]. Штаммы бактерий хранятся в коллекции отдела общей и почвенной микробиологии Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины.

Материалами исследования были: пенополиэтилен (ППЭ – производитель группа компаний SANPOL), этиленвинилацетат (ЭВА – производитель IZOLON) и резина (производитель Гниванский шиноремонтный завод).

Бактерии культивировали в жидкой среде Таусона с добавлением 20 мл на 100 мл мясопептонного бульона (МПБ) как источника азота и углерода, при температуре  $28 \pm 2$  °C. Образцы испытуемых материалов размером 20x20x2 мм взвешивали на электронных весах (ANG-200, AXIS), стерилизовали 72% этиловым спиртом (30 мин), УФ-лучами с длиной волны 256 нм



(15 мин) и погружали в стерильную среду Таусона, инокулированную одним из вышеуказанных штаммов бактерий в количестве  $10^6$  кл/мл. Контрольными были варианты с питательной средой Таусона, инокулированной отдельными штаммами тест-культур бактерий, без добавления материалов. Исследуемые образцы инкубировали в среде Таусона с добавлением МПБ и без МПБ, где исследованные материалы были единственным источником углерода. Продолжительность экспозиции материалов составляла 150 суток. В динамике через 8, 30, 90 и 150 суток испытываемые образцы извлекали из культуральной жидкости, промывали несколько раз дистиллированной водой, высушивали на воздухе, затем взвешивали.

Коэффициент деструкции образцов определяли по формуле: [12]

$$K_D = \left( \frac{m_0}{m_1} - 1 \right) \times 100,$$

где  $m_0$  – масса образца до начала эксперимента,

$m_1$  – масса образца в конце эксперимента.

Количество бактерий в культуральной жидкости определяли методом десятикратных предельных разведений [8]. Культуральные жидкости бактерий центрифугировали 20 минут при 2,0 g на центрифуге Eppendorf с ротором 5810R (Германия). В надосадочной жидкости определяли спектрофотометрически на приборе КФК-3 (Россия) липолитическую активность по реакции с *n*-нитрофенилпальмитатом [1], каталазную активность – с использованием 0,03% пероксида водорода, который образовывал с 4%-м раствором молибденортофосфата стойкий окрашенный комплекс [7]. Белок в культуральной жидкости определяли по общепринятому методу Лоури. Удельную активность исследованных ферментов рассчитывали по формулам, указанным в работах [1, 7] и выражали в ед $\times$ мг $^{-1}$  белка.

Изменение химического состава исследуемых материалов изучали методом инфракрасной Фурье-спектроскопии. Спектры регистрировали методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) на приставке ATR в спектральной области 400–4500 см $^{-1}$  на спектрофотометре «TENSOR-37» (Bruker Optik, Германия) [4]. Образцы исследовали в виде эластичных пленок, повторность трёхкратная. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ MS Excel 2010 и Origin Pro 2016 (ver. b 9.3.226. [www.originlab.com/](http://www.originlab.com/))

### Результаты исследований и их обсуждение

Взятые в опыт культуры углеводородокисляющие бактерии восстанавливают Fe(III), нитраты и окисляют углеводороды, что свидетельствует об их высокой метаболической активности [2]. В полноценной питательной среде Таусона (с добавлением МПБ), инокулированной исследуемыми штаммами бактерий и без добавления материалов наблюдали увеличение численности углеводородокисляющих бактерий до  $10^9$  клеток/мл в первые 8 суток эксперимента, в последующие сроки их количество уменьшалось. Количество бактерий в среде Таусона с добавлением МПБ и исследуемых материалов в течение 8 суток повышалось на 2–3 порядка относительно начального титра (таблица).



Таблица  
**Количество бактерий в среде Таусона в присутствии исследованных материалов,  
 $1 \times 10^8$  клеток в 1 мл культуральной жидкости**

Table  
**Bacteria titers in Tauson medium in the presence of studied materials,  $1 \times 10^8$  cells in 1 ml  
of cultural fluid**

Вариант опыта		Длительность экспозиции, сутки			
		8	30	90	150
Контроль (с МПБ)	<i>B. subtilis</i> 138	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$
	<i>P. pseudoalcaligenes</i> 109	$10^9$	$10^8$	$10^7$	$10^6$
	<i>R. erythropolis</i> 102	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$
Пенополиэтилен	<i>B. subtilis</i> 138 +МПБ	$10^{10}$	$10^8$	$10^6$	$10^5$
	<i>B. subtilis</i> 138	$10^7$	$10^6$	$10^6$	$10^5$
	<i>P. pseudoalcaligenes</i> 109+МПБ	$10^{10}$	$10^9$	$10^8$	$10^7$
	<i>P. pseudoalcaligenes</i> 109	$10^2$	$10^1$	$10^1$	$10^1$
	<i>R. erythropolis</i> 102+МПБ	$10^{10}$	$10^8$	$10^7$	$10^4$
	<i>R. erythropolis</i> 102	$10^7$	$10^6$	$10^6$	$10^5$
Этиленвинилацетат	<i>B. subtilis</i> 138 +МПБ	$10^{10}$	$10^7$	$10^6$	$10^5$
	<i>B. subtilis</i> 138	$10^7$	$10^6$	$10^6$	$10^5$
	<i>P. pseudoalcaligenes</i> 109+МПБ	$10^9$	$10^6$	$10^5$	$10^4$
	<i>P. pseudoalcaligenes</i> 109	$10^2$	$10^1$	$10^1$	$10^1$
	<i>R. erythropolis</i> 102+МПБ	$10^{10}$	$10^8$	$10^7$	$10^6$
	<i>R. erythropolis</i> 102	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^5$
Резина	<i>B. subtilis</i> 138 +МПБ	$10^{10}$	$10^8$	$10^6$	$10^5$
	<i>B. subtilis</i> 138	$10^9$	$10^8$	$10^7$	$10^6$
	<i>P. pseudoalcaligenes</i> 109+МПБ	$10^{10}$	$10^9$	$10^8$	$10^7$
	<i>P. pseudoalcaligenes</i> 109	$10^8$	$10^6$	$10^6$	$10^5$
	<i>R. erythropolis</i> 102+МПБ	$10^{10}$	$10^9$	$10^8$	$10^7$
	<i>R. erythropolis</i> 102	$10^8$	$10^8$	$10^7$	$10^6$

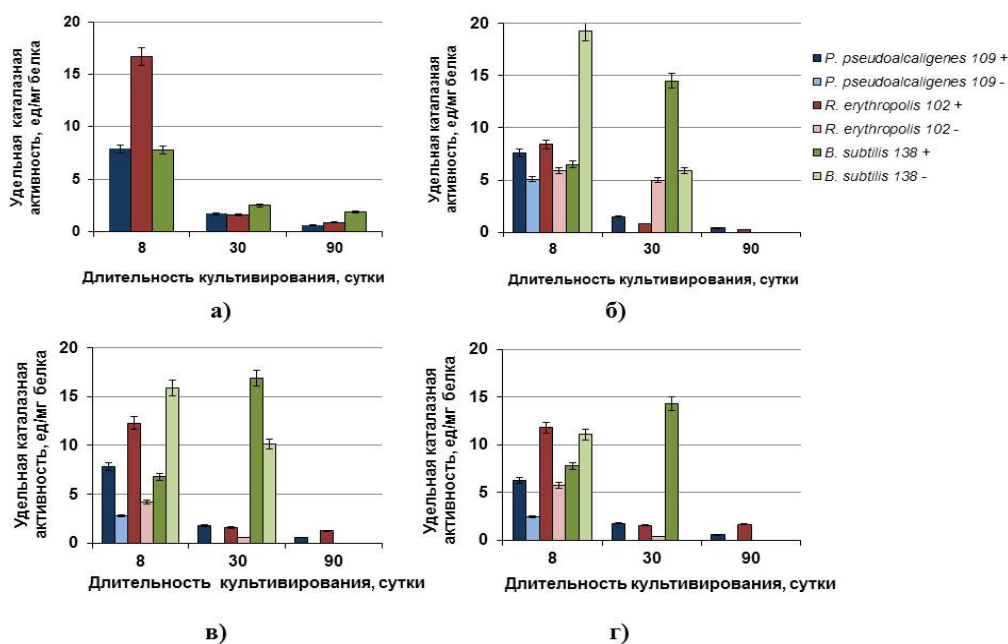
На среде Таусона, где ППЭ, ЭВА и резина внесены в качестве единственных источников энергии и углерода в период от 8 до 30 суток эксперимента, количество бактерий было меньше на 1–3 порядка в сравнении с их числом на среде с МПБ и материалами. На протяжении 90–150 суток численность бактерий на среде с МПБ в присутствии испытуемых материалов составляла  $10^4$ – $10^8$  клеток/мл, а на среде без МПБ  $10^5$ – $10^7$  клеток/мл. Необходимо отметить, что штамм *P. pseudoalcaligenes* 109 на среде с ППЭ и ЭВА без дополнительного источника азота и углерода рос слабо, количество бактерий



составляло –  $10^1$ – $10^2$  клеток/мл. Исключение составляет вариант с экспозицией резины, где титр этих бактерий на протяжении опыта (8–150 суток) был высоким  $10^5$ – $10^8$  кл/мл. Внесение в среду испытуемых материалов как дополнительных источников углерода и азота способствовало увеличению численности бактерий.

Как известно, микроорганизмы синтезируют большое количество ферментов, основная функция которых состоит в ускорении и регуляции всех химических реакций, необходимых для бактериальной клетки [5, 6, 9]. Культуры бактерий в присутствии исследованных материалов проявляли разную ферментативную активность в зависимости от вида материала.

Каталазная активность в контроле (инокулированная бактериями среда с МПБ без внесения материалов) была выше, чем в присутствии материалов. Среди исследуемых штаммов бактерий наиболее высокая каталазная активность выявлена на 8-е сутки культивирования *R. erythropolis* 102, она составляла  $16,7 \pm 2,6$  ед./мг белка, но в присутствии резины, ППЭ и ЭВА она уменьшалась в 1,4–2,0 раза (рис. 1).



**Рис. 1. Каталазная активность углеводородокисляющих бактерий при культивировании с полимерными и резинотехническими материалами**

Примечания: а) контроль (без внесения материала); б) пенополиэтилен; в) этиленвинилацетат; г) резина. «+» – питательная среда с внесением источника углерода, «-» – питательная среда без источника углерода

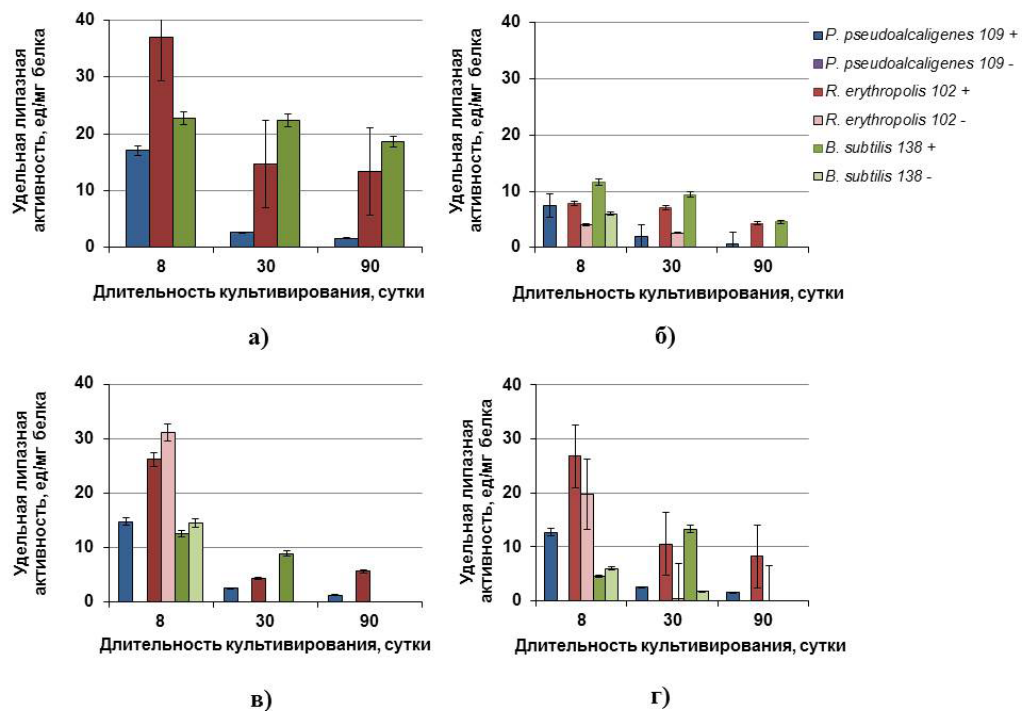
**Fig. 1. Specific catalase activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria during cultivation with polymeric and rubber materials**

Notes: a) control (without materials); b) foamed polyethylene; c) ethylene vinyl acetate; d) rubber. «+» – cultivation media with carbon source, «-» – cultivation media without carbon source



Удельная каталазная активность в присутствии исследуемых материалов понижалась у штаммов *P. pseudoalcaligenes* 109, *R. erythropolis* 102 в 1,5–3,2 и 2,8–3,9 раза, соответственно. Для штамма *B. subtilis* 138 внесение в среду ППЭ, ЭВА и резины, как единственного источника углерода, способствовало повышению каталазной активности в 1,4–2,5 раза (рис. 1). Следует отметить, что с увеличением длительности экспозиции до 90 суток каталазная активность существенно снижалась, по сравнению с активностью на 8-е сутки эксперимента.

На полноценной среде без внесения материалов высокая липолитическая активность, также как и каталазная, обнаружена у *R. erythropolis* 102 (37,1±2,1 ед/мг белка) по сравнению с другими культурами бактерий (рис. 2).



**Рис. 2. Липолитическая активность углеводородокисляющих бактерий при культивировании с полимерными и резинотехническими материалами**  
 Примечания: а) контроль (без внесения материала); б) пенополиэтилен; в) этиленвинилацетат; г) резина; «+» – питательная среда с внесением источника углерода, «-» – питательная среда без источника углерода

**Fig. 2. Specific lipase activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria during cultivation with polymeric and rubber materials**

Notes: a) control (without materials); b) foamed polyethylene; c) ethylene vinyl acetate; g) rubber; «+» – cultivation media with carbon source, «-» – cultivation media without carbon source

В присутствии исследованных материалов она уменьшалась в 1,4–4,7 раза. Удельная липазная активность *P. pseudoalcaligenes* 109 при внесении в среду полимерных материалов понижалась в 2,3 раза относительно контроля.





В присутствии ППЭ липазная активность исследуемых бактерий была значительно меньшей ( $7,4 \pm 0,4 - 6,0 \pm 0,3$  ед./мг белка), в сравнении с другими материалами. Внесение в питательную среду ЭВА и резины, как единственных источников углерода и энергии, также снижало липазную активность бактерий: в этих условиях она составляла  $14,5 \pm 1,3 - 31,1 \pm 1,5$  и  $6,0 \pm 0,9 - 19,7 \pm 0,3$  ед/мг белка, соответственно. В ходе наблюдений во всех вариантах опыта самая высокая липазная активность отмечена на 8-е сутки эксперимента, с увеличением продолжительности экспозиции до 90-и суток она снижалась.

Известно, что оксидоредуктазы ускоряют окислительно-восстановительные процессы, протекающие в клетках бактерий. В частности, в присутствии каталазы происходит реакция распада пероксида водорода на воду и кислород, а также окисление гидроксильных групп. Роль каталазы состоит в защите микроорганизмов от токсического действия пероксида водорода, который образуется при биологическом окислении. Встречаются данные о том, что коррозионная опасность грунтов связана с активностью каталазы. Снижение её активности достоверно характеризует более высокую степень разрушения металла. Коррозия развивается при снижении активности каталазы, нейтрализующей пероксид водорода, выделяющейся в процессах микробного метаболизма [12]. Кроме того установлено, что значительное снижение внеклеточной каталазной активности культуры *Candida lipolytica* на углеводородсодержащих субстратах характеризует её как эффективного нефтеструктора [9]. Одним из показателей интенсивности процессов окисления органического вещества служит изменение активности каталазы [3]. Выявлена тесная корреляционная связь между степенью снижения каталазной активности штаммов-деструкторов и эффективностью потребления нефти и нефтепродуктов. Для бактерий – активных деструкторов характерно увеличение численности и снижение каталазной активности при контакте с нефтепродуктами. Отмечено, что у штаммов бактерий, не использующих нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и энергии, численность и каталазная активность практически не меняются в процессе эксперимента, оставаясь на уровне, близком к исходному. По мнению О.А. Гоголевой [3], каталазная активность отражает интенсивность процесса микробной деструкции, что позволяет предложить её использование в качестве индикатора при отборе эффективных штаммов-деструкторов нефти и нефтепродуктов [3]. В наших исследованиях мы наблюдали, что у штаммов *R. erythropolis* 102 и *P. pseudoalcaligenes* 109 каталазная активность на среде, где единственным источником углерода служили исследуемые материалы, снижалась, и только у *B. subtilis* 138 она повышалась.

Согласно данным некоторых авторов, углеводороды активизируют липолитическую активность почв, при этом параллельно с активацией липолиза наблюдается увеличение численности углеводородокисляющих бактерий и уменьшение количества нефтепродуктов [5]. Почвы, загрязненные нефтью, содержат значительное количество битумов, которые стимулируют активность липаз. Поэтому предлагают использовать липазную активность как один из показателей биодеструкции нефти и нефтепродуктов [5]. Следует



полагать, что одним из механизмов биоповреждения защитных материалов является синтез коррозионно-активными бактериями гидролаз, в частности, липазы, которая разрушает сложные эфирные связи, отщепляя атомы водорода от  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  групп с образованием  $-\text{C}=\text{C}-$  связей, т.е. происходит дегидрирование углеродных цепей и преобразование насыщенных соединений в ненасыщенные, которые могут быть агрессивными по отношению к материалам.

Важным аспектом проблемы биоповреждения разных материалов является утилизация отходов последних после окончания сроков их использования. Показателем деградации материалов является потеря массы образцов под действием бактерий. Через 90 суток эксперимента потеря массы образцов резины на среде с МПБ под влиянием *R. erythropolis* 102 составляла  $2,7 \pm 0,1$  мг (KD= 0,11%) при исходной массе 2,41 г. В варианте опыта, где резина была внесена как единственный источник углерода, потеря массы образца под действием *R. erythropolis* 102 и *B. subtilis* 138 составила  $10 \pm 0,9$  и  $16,6 \pm 2,6$  мг соответственно (KD= 0,37% и 0,6%) при исходной массе 2,69 и 2,71 г, соответственно. Для ППЭ и ЭВА коэффициент деструкции был незначительный.

Поскольку, потеря массы образцов в результате действия бактерий оказалась незначительной, но отмечено интенсификацию ферментативной активности бактерий, целесообразно было проведение ИК-спектроскопии исследованных материалов.

Так, интенсивность полос  $2920 \text{ см}^{-1}$  (валентные ассиметричные колебания метильных и метиленовых групп),  $2800 \text{ см}^{-1}$ , (валентные симметричные колебания метильных и метиленовых групп) ИК-спектров пенополиэтилена в варианте с *B. subtilis* 138 за 90-о суток изменилась незначительно (рис. 3).

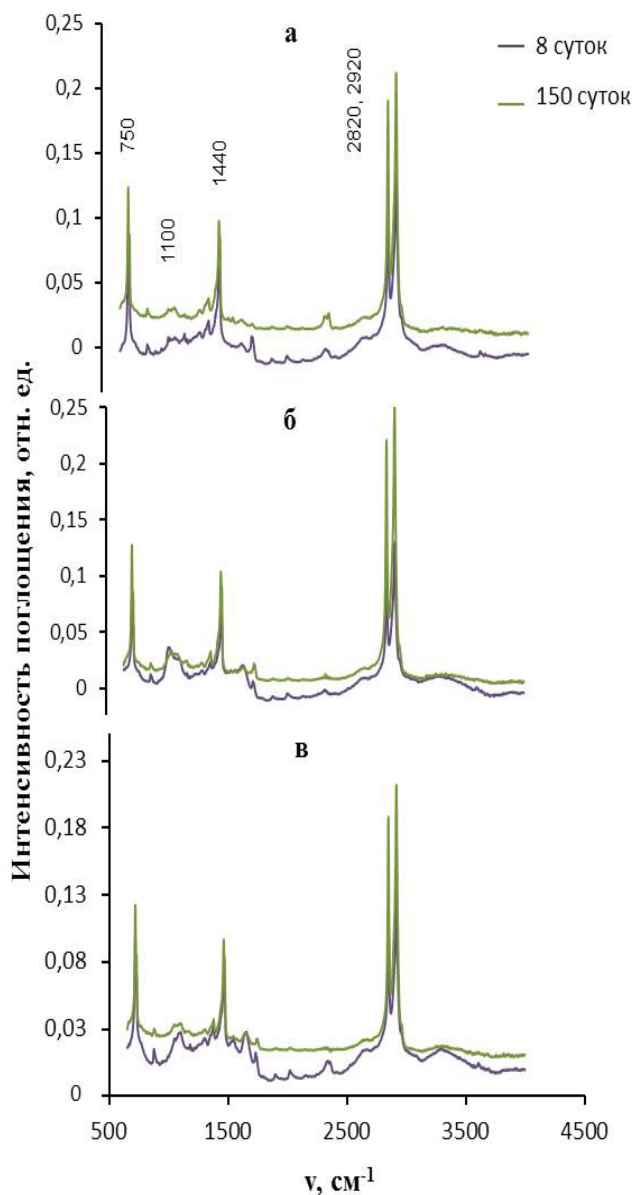
На 8-е сутки воздействия бактерий в ИК-спектрах образцов появлялась полоса  $1050 \text{ см}^{-1}$  колебания  $\begin{array}{c} | \quad | \\ -\text{C}-\text{O}-\text{C}- \\ | \quad | \end{array}$  групп, которая отсутствовала в контроле (стерильная среда Таусона с пенополиэтиленом). Затем, интенсивность полосы уменьшалась и через 150 суток наблюдался только след полосы в сравнении с контролем. Аналогичные изменения в спектре полос поглощения исследуемых материалов происходили под действием *R. erythropolis* 102.

В спектре ППЭ появлялась полоса  $1100 \text{ см}^{-1}$  колебания  $\begin{array}{c} | \quad | \\ -\text{C}-\text{O}-\text{C}- \\ | \quad | \end{array}$  групп. За период до 150 суток её интенсивность значительно уменьшалась. Кроме того, появлялась полоса  $2400 \text{ см}^{-1}$ , которая через 150 суток практически исчезала (рис. 3).

В спектре образца ЭВА, который экспонировался в культуре *B. subtilis* 138, начиная с 8 суток, появлялась полоса поглощения  $1000 \text{ см}^{-1}$  колебания

$\begin{array}{c} | \quad | \\ -\text{C}-\text{O}-\text{C}- \\ | \quad | \end{array}$  групп, но к концу экспозиции (150 суток) остался только след полосы (рис. 4).





**Рис. 3. ИК-спектры образцов пенополиэтилена (ППЭ) при культивировании с углеводородокисляющими бактериями**  
 Примечания: а) – контроль среда Таусона; б) – *B. subtilis* 138; в) – *R. erythropolis* 102

**Fig. 3. IR-spectrum of foamed polyethylene (FPE) at the cultivation with hydrocarbon-oxidizing bacteria**

Notes: a) – control Tauson media; б) – *B. subtilis* 138; в) – *R. erythropolis* 102

Следует отметить, что в течение всего опыта не обнаружены изменения полос поглощения ИК-спектров резины под действием углеводородокисляющих бактерий в сравнении с контролем.

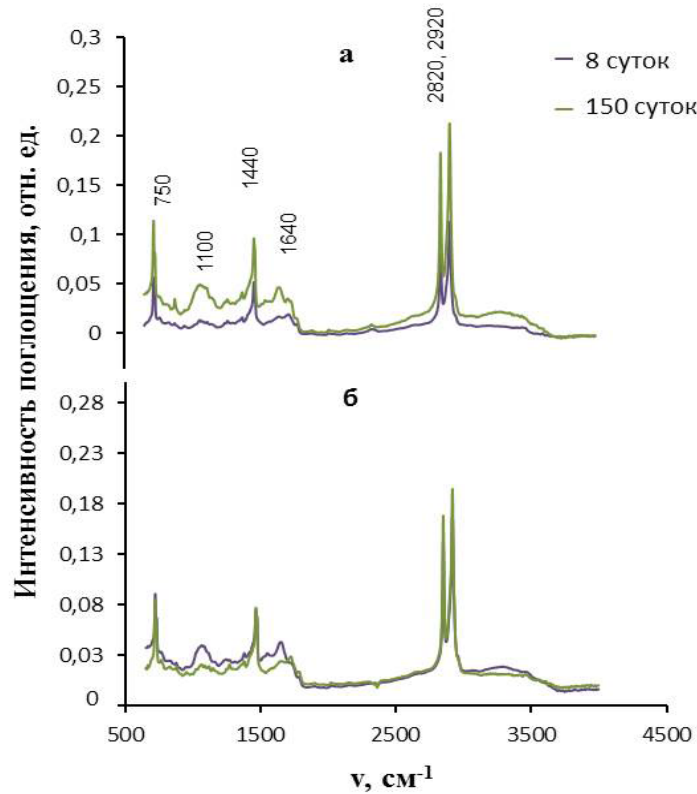


Рис. 4. ИК- спектры образцов этиленвинилацетата (ЭВА) при культивировании с углеводородокисляющими бактериями  
Примечания: а) – контроль среда Таусона; б) – *B. subtilis* 138

Fig. 4. IR-spectrum of ethylenevinylacetate (EVA) at the cultivation with hydrocarbon-oxidizing bacteria  
Notes: а) – control Tauson media; б) – *B. subtilis* 138

Согласно спектральным данным, в химической структуре ППЭ, ЭВА и резины, которые поддавались воздействию углеводородокисляющих бактерий, происходило частичное разрушение функциональных карбонильных

и эфирных связей сополимера этиленвинилацетата, что может приводить к разрыву олигомерных цепей полимера и, как следствие, к уменьшению прочности материалов. Также в среде с испытуемыми материалами, возможно, происходили окислительно-восстановительные процессы, о которых свидетельствовали изменения в каталазной активности бактерий.

Таким образом, проведённые исследования показали, что присутствие в среде пенополиэтилена, этиленвинилацетата, резины, как единственных источников углерода и энергии, способствовало понижению каталазной активности у *R. erythropolis* 102 и *P. pseudoalcaligenes* 109 и липазной активности у *R. erythropolis* 102 и *B. subtilis* 138.



Д. Р. Абдуліна<sup>1</sup>, Ж. П. Коптева<sup>1</sup>, Г. Є. Коптева<sup>1</sup>,  
М. Я. Вортман<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,  
вул. Заболотного, 154, Київ, Україна, 03143, e-mail: adara@ukr.net

<sup>2</sup>Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України,  
Харківське шосе, 48, Київ, Україна, 02160

## ВПЛИВ ПОЛІМЕРНИХ І ГУМОТЕХНІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ НА ВУГЛЕВОДЕНЬОКИСНЮВАЛЬНІ БАКТЕРІЇ

### Реферат

Полімерні матеріали широко використовуються у будівництві і різних галузях промисловості, в зв'язку з чим їх стійкість до мікробної деструкції привертає увагу дослідників. **Мета.** Визначення впливу пінополіетилену (ППЕ), етиленвінілацетату (ЕВА) та гуми на вуглеводеньокиснювальні бактерії: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102, *Bacillus subtilis* 138, що виділені із пошкоджених захисних покриттів газопроводів. **Методи.** Кількість клітин бактерій розраховували методом граничних розведень, коефіцієнт деструкції – гравіметрично за втратою маси зразків, ферментативну активність – спектрофотометрично на приладі КФК-3, зміни у компонентному складі матеріалів методом інфрачервоної Фур'є-спектроскопії на приладі TENSOR-37. **Результати.** Показано, що за присутності досліджуваних матеріалів як єдиного джерела карбону каталазна активність зменшувалася у *P. pseudoalcaligenes* 109, *R. erythropolis* 102 в 1,5–3,2 та 2,8–3,9 рази, відповідно, а у *B. subtilis* 138 – підвищувалася в 1,4–2,5 рази, порівняно із контролем (середовище Таусона, інокульоване бактеріями без внесення матеріалів). Ліпазна активність *B. subtilis* 138 та *R. erythropolis* 102 за присутності досліджуваних матеріалів зменшувалася в 1,2–3,8 рази порівняно із контролем. Вивчення компонентного складу полімерних та гумотехнічних матеріалів після впливу бактерій (методом інфрачервоної спектроскопії) показало, що склад матеріалів хімічно не змінювався. За 90 діб експозиції коефіцієнт біодеструкції гуми складав 0,4 0,6% (втрата маси  $10 \pm 0,9$  та  $16,6 \pm 2,6$  мг залежно від культури бактерій); пінополіетилену та етиленвінілацетату був незначний 0,1% (втрата маси не перевищувала  $0,9 \pm 0,01$  мг). **Висновки.** Внесення в середовище Таусона досліджуваних матеріалів, як єдиних джерел вуглецю та енергії, сприяло зниженню каталазної активності у *R. erythropolis* 102 та *P. pseudoalcaligenes* 109, а також зниженню ліпазної активності у *R. erythropolis* 102 та *B. subtilis* 138.

**Ключові слова:** біостійкість, вуглеводеньокиснювальні бактерії, полімерні і гумотехнічні матеріали, ферментативна активність, інфрачервоні спектри.



**D. R. Abdulina<sup>1</sup>, Zh. P. Kopteva<sup>1</sup>, A. E. Kopteva<sup>1</sup>,  
M. Ya. Vortman<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,  
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, Ukraine, 03143, e-mail: adara@ukr.net

<sup>2</sup> Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine,  
48, Kharkivske shosse, Kyiv, Ukraine, 02160

## **INFLUENCE OF POLYMERIC AND RUBBER MATERIALS ON HYDROCARBON-OXIDIZING BACTERIA**

### **Summary**

*Polymeric materials are widely used in buildings and various industrial branches and consequently their persistence to microbial remediation draws scientist's attention. **Aim.** To determine the influence of foamed polyethylene, ethylenevinylacetate and rubber on hydrogen-oxidizing bacteria: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102, *Bacillus subtilis* 138, isolated from damaged protective gas pipeline coatings. **Methods.** Bacterial quantity was determined by the serial dilution method; destruction index – gravimetrically for the weight loss; enzymatic activity – by the spectrophotometry on the KFK-3; changes in the chemical compound – by the IR Fourier spectroscopy on the TENSOR-37. **Results.** It was shown that in the presence of the studied materials as a sole carbon source catalase activity of *P. pseudoalcaligenes* 109, *R. erythropolis* 102 were decreased in 1.5–3.2 and 2.8–3.9, respectively, and in *B. subtilis* 138 were increased in 1.4–2.5 times than in control (Tauson media inoculated with bacteria and without material). Lipase activity of *B. subtilis* 138 and *R. erythropolis* 102 under the presence of studied materials were decreased in 1.2–3.8 times than in control. The study (by the IR-spectroscopy) of the polymeric and rubber materials components after the bacterial influence have shown that content of materials was not chemically changed. During 90 days of exposition the destruction coefficient of rubber was 0.4–0.6% (weight loss 10±0.9 and 16.6±2.6 mg depend on bacterial culture). For foamed polyethylene and ethylenevinylacetate destruction coefficient was not significant (weight loss up to 0.9±0.01 mg). **Conclusions.** Studied materials had been put in Tauson media as a sole carbon and energy source promoted the decrease of catalase activity in *R. erythropolis* 102 and *P. pseudoalcaligenes* 109, as well as lipolytic activity decreasing in *R. erythropolis* 102 and *B. subtilis* 138.*

*Key words: bioresistance, hydrocarbon-oxidizing bacteria, polymeric and rubber materials, enzymatic activity, IR- spectra.*

### **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Айзенберг В. Л., Карпель В. И., Сырчин С. А., Седина С. А., Капичон А. П. Апробация количественного метода определения липолитической активности с использованием хромогенного субстрата // Микробиол. журн. – 1995. – 57, № 5. – С. 84–89.
2. Андреюк К. И., Козлова И. П., Коптева Ж. П., Пилишенко-Новохатний А. И., Заніна В. В., Пуриш Л. М. Мікробна корозія підземних споруд. Київ: Наукова думка. – 2005. – 258 с.



3. Гоголева О. А. Каталазная активность углеводородокисляющих бактерий. Автореф. дис. канд. биол. наук. Оренбург. 2012. – 18 с.

4. Деев И. А., Буриндин А. Н., Ельцов О. С. Сравнение степени кристалличности полиэтилена и пенополиэтилена // Вестник Казанского университета. – 2012. – С.14–17.

5. Киреева Н. А., Тарасенко Е. М., Шамаева А. А., Новоселова Е. Н. Влияние нефти и нефтепродуктов на активность липазы серой лесной почвы // Почвоведение. – 2006. № 8. – С. 1005–1011.

6. Коптева Ж. П., Занина В. В., Борецкая М. А., Коптева А. Е., Козлова И. А. Влияние липолитической и каталазной активности гетеротрофных бактерий на физико-механические свойства покрытия Поликен 980-25 // Микробиол. журн. – 2013. – Т. 75, № 1. – С.41–47.

7. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майоров И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. 1. – С. 16–18.

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

9. Рябцева Н. Д., Никитина В. С., Абдуллин М. И., Багаутдинов Р. Ф., Кадиров А. А. Изучение каталитических процессов микробного окисления нефтяных углеводородов // Вестник Башкирского университета. – 2016. Т. 21, № 2. – С. 308–313.

10. Тугай Т. І., Жданова Н. М., Бузарова О. І. Вплив іонізуючого випромінювання низької інтенсивності на активність каталази та супероксиддисмутази *Normosconis resinosa* // Мікробіол. журн. – 2009. – Т. 71, № 1. – С. 16–21.

11. Ямпольская Т. Д. Природа и условия развития биокоррозии биоповреждений в северных регионах (на примере г. Сургута) // Автореф. дис. канд. биол. наук. Санкт-Петербург. Пушкин. 2005. – 20 с.

12. ISO 846:2019. Plastics – Evaluation of the action of microorganisms. Pub. date. 03.2019; 26p.

13. Teeraphatpormchai T., Nakajima-Kambe T., Shigeno-Akutsu Y., Nakayama M. et al. Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester – based biodegradable plastics // Biotechnol Lett. – 2003. – 25. N 1. – P. 23–28.

## References

1. Aizenberg VL, Karpel VI, Syrchin SA, Sedina SA, Kapichon AP. Testing a quantitative method for determining lipolytic activity using a chromogenic substrate. Mikrobiol. Zhurn. 1995; 57(5):84-89. (In Russian)

2. Andreyuk KI, Kozlova IP, Kopteva ZhP, Pilyashenko-Novokhatny AI, Zanina VV, Purish LM. Microbial corrosion of underground structures. Kyiv: Naukova dumka; 2005. 258. (In Ukrainian)

3. Gogoleva O.A. Catalase activity of hydrogen-oxidizing bacteria. Avtoref. cand biol. Sci. Orenburg. 2012. 20. (In Russian)

4. Deev IA, Burdynin AN, El'tsov OS. Sravnenye stepeni krystalichnosti polyethylena i penopolyethylena. Vesnyk Kazanskogo Universiteta. 2012:14-17.

5. Kireeva NA, Tarasenko EM, Shamaeva AA, Novoselova EN. The effect of oil and oil products on the activity of lipase of the gray forest soil. Soil Science.



2006; 8:1005-1011. *(In Russian)*

6. Kopteva ZP, Zanina VV, Boretskaya MA, Kopteva AE, Kozlova IA. Influence of lipolytic and catalase activity of heterotrophic bacteria on the physic-mechanical properties of Polyken 980-25 coating. Mikrobiol. zhurn. 2013; 75(1):41-47. *(In Russian)*

7. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorov IG, Tokarev VE. Method for the determination of catalase activity. Laboratory work. 1988; 1: 16-18. *(In Russian)*

8. Netrusov AI, Egorova MA, Zakharchuk LM, Kolotilova NN. Practice in microbiology. Moscow: Academia Publishing; 2005. 608. *(In Russian)*

9. Ryabtseva ND, Nikitina VS, Abdullin MI, Bagautdinov RF, Kadirov AA. Study of the catalytic processes of microbial oxidation of petroleum hydrocarbons. Vestnik of the Bashkir University; 2016; 21(2): 308-313. *(In Russian)*

10. Tugay TI, Zhdanova NM, Buzarova OI. Influence of ionizing radiation of low intensity on activity of catalase and superoxide dismutase of *Hormoconis resiniae*. Mikrobiol. Zhurn. 2009;71(1):16-21. *(In Ukrainian)*

11. Yampolskaya TD. The nature and conditions for the development of biocorrosion of bio-damages in the northern regions (on the example of Surgut). PhD thesis, Saint-Petersburg. Pushkin; 2005. 20. *(In Russian)*

12. ISO 846:2019. Plastics – Evaluation of the action of microorganisms. Pub. Date 03.2019; 26.

13. Teeraphatpormchai T, Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nakayama M. et al. Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester – based biodegradable plastics. Biotechnol Lett. 2003; 25(1): 23-28.

Стаття надійшла до редакції 29.05.2019 р.





**Т. А. Круподьорова, В. Ю. Барштейн**

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,  
вул. Осиповського, 2А, м. Київ, 04123, Україна, тел.: +38(067)5088659,  
e-mail: barmash14@gmail.com

## **АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ МАКРОМІЦЕТІВ ПРОТИ *MUCOR SP. IFBG 139***

**Мета.** Провести скринінг макроміцетів на здатність проявляти антагоністичну активність проти мікроміцета *Mucor sp. IFBG 139*. **Методи.** Антагоністичну активність представників 30 видів макроміцетів щодо *Mucor sp. IFBG 139* визначали методом подвійних культур. **Результати.** Досліджені макроміцети проявили незначну антагоністичну активність щодо обраного штаму *Mucor sp. IFBG 139*. Встановлено, що *Mucor sp. IFBG 139* пригнічує ряд видів макроміцетів: спокійне наростання щодо 4 видів, часткове – 11 видів та повне – 9 видів. Для певних видів виявлено взаємний антагонізм, пригнічення макроміцетів варіювалося від 38,9 до 51,1% і мікроміцета – від 54,4 до 77,7%. Взаємне гальмування росту колоній при контакті виявлено для 5 базидієвих видів: *Crinipellis schevczenkoi*, *Fomitopsis pinicola* (однаковий рівень пригнічення), *Ganoderma applanatum*, *Laetiporus sulphureus*, *Lyophyllum shimeji* та аскомікотового виду *Ophiocordyceps sinensis*. **Висновки.** Результати проведених досліджень поповнюють відомості про антагоністичні властивості грибів. Максимальний індекс пригнічення росту *Mucor sp. IFBG 139* встановлено при сумісному культивуванні з *F. pinicola*. Гриб *Lentinula edodes* здатний пригнічувати ріст дослідженого мікроміцета, продукуючи метаболіти з антифунгальною дією щодо *Mucor sp. IFBG 139*. Ці два види ксилотрофних базидієвих грибів можуть бути біотехнологічними об'єктами для подальших досліджень з метою вивчення їх антифунгальних речовин й розробки потенційно ефективної фунгіцидної продукції.

**Ключові слова:** макроміцети, *Mucor sp. IFBG 139*, антагонізм, антифунгальна активність.

Мукормікоз – небезпечна для життя, часто смертельна, інфекція, яка виникає у пацієнтів, які є імунокомпрометованими внаслідок діабетичного кетоацидозу, нейтропенії, трансплантації органів, онкологічних захворювань та / або підвищення рівня доступного заліза в сироватці крові [9]. Викликати мукормікоз можуть представники родини *Mucoraceae*, дуже поширені в природі, зокрема в ґрунті, які розвиваються як сапрофіти на харчових продуктах, кормах для худоби, овочах та фруктах при їх зберіганні. Ряд видів цих грибів використовуються протягом століть у виробництві продуктів харчування – для дозрівання сирів або виробництва ферментованої їжі. Також використовують мукоральні гриби для виробництва ферментів та біопалива [11]. В той



же час, представники родини *Mucoraceae*, як етіологічні агенти, що викликають мукомікоз, здатні уражувати практично будь-яку частину тіла [2; 8; 14]. Найчастіше страждають синуси або легені після вдихання спор грибів з повітря, або шкіра після того, як грибок потрапляє в шкіру через розріз, опік або інший тип травми шкіри. До основних форм клінічних проявів мукомікозу також належать шлунково-кишкові та дисеміновані або системні симптоми [15]. Таким чином, представники родини *Mucoraceae* заслуговують на увагу. Незважаючи на бурхливий розвиток діагностичних методів та появу сучасних антимікотичних засобів, діагностика та лікування мукомікозів залишається складним завданням медицини [10; 15]. Мукоральні гриби стійкі до сучасних лікарських засобів [11]. Це свідчить про необхідність й актуальність пошуку нових дієвих препаратів, перш за все, натурального походження (низька побічна дія та потенційно широкий спектр дії).

Біологічний метод боротьби з патогенними мікроорганізмами, заснований на використанні явища антагонізму і конкуренції між організмами, набуває останнім часом все більшого значення. Вивченню антагоністичних властивостей макро- і мікроміцетів у дуальній культурі присвячено ряд скринінгових робіт [1; 3; 4]. З'ясована здатність ксилотрофних базидієвих видів пригнічувати ріст патогенних грибів, зокрема *Aspergillus* sp. [7], *Bipolaris sorokiniana* [1; 3], *Ceratobasidium cereale* [1; 3], *Clonostachys rosea* [4], *Fusarium culmorum* [1; 3; 5], *F. oxysporum* [1], *Fusarium* sp. [7], *Gaeumannomyces tritici* [1; 3], *Ophiostoma ulmi*, *Pestalotiopsis funerea* [1], *Pythium* sp. [7; 13], *Trichoderma harzianum* [4; 5], *T. pseudokoningii*, *T. viride* [4], *Verticillium* sp. [13]. Значний антифунгальний потенціал макроміцетів свідчить про важливість й доцільність даного напрямку досліджень. Враховуючи, що не лише види, а й штами грибів можуть значно відрізнятися за своїми властивостями, здійснення пошуку грибів з антифунгальними властивостями є першим цілеспрямованим етапом відбору перспективних продуцентів з фунгіцидною дією.

Метою роботи було провести скринінг макроміцетів на здатність проявляти антагоністичну активність проти мікроміцета *Mucor* sp. IFBG 139.

### Матеріали і методи дослідження

Об'єктами дослідження були 30 видів макроміцетів з різних систематичних (Basidiomycota, Ascomycota) та екологічних (ксилотрофи, гумусові сапротрофи, ентомофіли, підстилковий сапротроф) груп з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України (ІБК) [6]: *Auriporia aurea* (Peck) Ryvarden 5048, *Coprinus comatus* (O F. Müll.) Pers. 137, *Cordyceps militaris* (L.) Fr. 1862, *Crinipellis schevczenkoi* Bukhalo 31, *Cyclocybe aegerita* (V. Brig.) Vizzini 1853, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer 1878, *Fomes fomentarius* (L.) Fr. 355, *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai 327, *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. 1523, *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 1701, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. 1900, *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray 976, *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. 970, *Hypsizygus marmoreus* (Peck) H.E. Bigelow 2006, *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát. 1877, *Irpiciporus litschaueri* (Lohwag) Zmitr. 5312, *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill 352, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 502, *Lepista luscina* (Fr.) Singer 64,



*Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo 1662, *Morchella esculenta* (L.) Pers. 1953, *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 1928, *Oxyporus obducens* (Pers.) Donk 5085, *Phellinus igniarius* (L.) Quél. 1578, *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn 1526, *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél. 2015, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. 551, *Schizophyllum commune* Fr. 1768, *Trametes versicolor* (L.) Lloyd 353, *Xanthoporia radiata* (Sowerby) Tura, Zmitr., Wasser, Raats & Nevo 2454 і *Mucor sp.* IFBG 139 з Колекції мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України». Назви грибів наведено відповідно до номенклатурної бази даних IndexFungorum (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

Культури грибів зберігали в холодильнику за температури  $4 \pm 1$  °C в пробірках з картопляно-декстрозним середовищем (КДА, рН 5,5). Гриби кожного виду пересівали в чашки Петрі з КДА і інкубували за температури  $26 \pm 1$  °C до повного обростання чашки. У фазі активного росту культур вирізували міцеліальні диски діаметром 8 мм і використовували як інокулят для експериментів.

Антагоністичну активність макроміцетів щодо *Mucor sp.* IFBG 139 вивчали у чашках Петрі на КДА методом подвійних культур: диски діаметром 8 мм, один з колоній макроміцетів і один з колоній мікроміцета, поміщали на поверхню агару один навпроти одного на відстані 5 мм від краю чашки Петрі. Відразу після інокуляції чашки Петрі герметизували плівкою «Parafilm «М» і інкубували в темряві за температури  $26 \pm 1$  °C протягом 30 днів. Антагоністичну активність міцелію культур, що контактують, описували за спеціальною шкалою реакцій антагонізму, що включає 3 типи (А і В – взаємне гальмування росту колоній при контакті та на дистанції, відповідно, С – спокійне наростання без затримки росту гриба) та 4 підтипи (часткове та повне наростання після взаємного гальмування росту колоній при контакті – типи  $C_{A1}$ ,  $C_{A2}$  та на дистанції – типи  $C_{B1}$ ,  $C_{B2}$ ) [3; 4].

Для грибів, що продемонстрували реакції наростання типів А і В, визначали пригнічення росту культур, що контактують: диски діаметром 8 мм, один – з колоній макроміцетів і один – з колоній мікроміцета, поміщали на поверхню агару один напроти одного на відстані 30 мм. І одночасно для контролю росту у монокультурі по одному 8 мм диску з відповідним грибом поміщали у центр чашки Петрі. Відразу після інокуляції чашки Петрі герметизували плівкою «Parafilm «М» й інкубували в темряві за температури  $26 \pm 1$  °C 7 днів. Вимірювали діаметр колоній та розраховували відсоток пригнічення росту за формулою Вінсента [16]:

$$I = \frac{C - T}{C} \times 100,$$

I – пригнічення росту, %,

C – діаметр колонії гриба в монокультурі (контроль),

T – діаметр колонії гриба в подвійній культурі.

Повторність дослідів трикратна, результати експериментів оброблено за допомогою пакету прикладних програм Microsoft Office Excel 2013. На рисун-



ках представлені середні арифметичні та їх стандартні похибки, за достовірні вважали дані за  $P \leq 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

Методом подвійних культур досліджено взаємодію макроміцетів та *Mucor* sp. IFBG 139. За реакціями наростання з'ясована антагоністична активність грибів (рис. 1, 2). Отримані дані свідчать про переважання одностороннього антагонізму (пригнічує розвиток або викликає загибель макроміцета) *Mucor* sp. IFBG 139 на рівні 80%, що включає тип С та підтипи  $C_{A1}$  і  $C_{A2}$  (рис. 1). Виявлено наростання міцелію *Mucor* sp. IFBG 139 на міцелій чотирьох ксилотрофних видів *G. frondosa*, *H. erinaceus*, *H. marmoreus*, *Ph. igniarius* за типом С (спокійне наростання без затримки росту мікроміцета). Такий тип антагонізму раніше вже описаний в подвійній культурі мікроміцетів та ксилотрофних макроміцетів: *Fusarium culmorum* з *Ganoderma adspersum*, *L. sulphureus* [1]; *Trichoderma* spp. і *Pholiota populnea* [4]; *Phythium* sp. і *Agrocybe pediades* [7].

Після взаємного гальмування росту видів грибів при контакті спостерігали часткове наростання міцелію *Mucor* sp. IFBG 139 (підтип  $C_{A1}$ ) на міцелій десяти видів базидієвих грибів (ксилотрофів *A. aurea*, *C. aegerita*, *G. lucidum*, *F. betulina*, *I. obliquus*, *O. obducens*, *P. eryngii*, *S. commune*, *T. versicolor*, *X. radiata*) та ентомофільного сумчастого гриба *C. militaris*. Подібну антагоністичну активність виявлено при сумісному культивуванні мікроміцетів і ксилотрофних базидієвих грибів: *F. culmorum* з *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. resinaceum*, *Meripilus giganteus*, *L. sulphureus*; *F. oxysporum* з *Lentinus arcularius*, *T. versicolor*; *Rhizoctonia solani* з *F. fomentarius*, *G. lucidum*, *G. resinaceum*, *F. betulina*, *T. gibbosa* [1]; *Bipolaris sorokiniana* з *L. edodes*, *Pholiota aurivella*, *Ph. populnea* [3]; *T. harzianum* з *Cerioporus squamosus*, *L. edodes*, *Hypholoma lateritium*, *Pleurotus cornucopiae*; *T. pseudokoningii* з *C. squamosus*, *Ph. aurivella*, *P. ostreatus*, *T. versicolor*; *T. viride* з *C. squamosus*, *Flammula alnicola*, *Ph. aurivella*, *P. cornucopiae* [4].

Повне наростання міцелію *Mucor* sp. IFBG 139 після взаємного гальмування росту видів грибів при контакті (підтип  $C_{A2}$ ) відмічене на міцелій шести ксилотрофів (*C. comatus*, *H. marmoreus*, *F. fomentarius*, *F. velutipes*, *I. litschaueri*, *P. ostreatus*) та трьох гумусових сапроторофів (*L. luscina*, *L. shimeji*, *M. esculenta*). Подібна реакція наростання встановлена в дуальній культурі фітопатогенних грибів і ксилотрофних базидієвих грибів: *F. culmorum* з *F. fomentarius*, *G. adspersum*, *Lentinus tigrinus*, *Lenzites betulinus*, [1], *Pleurotus tuberregium* [5]; *T. harzianum* з *F. velutipes*, *F. alnicola*, *Kuehneromyces mutabilis* та *Ph. aurivella* [4].

Про двосторонній антагонізм грибів свідчать розраховані відсотки пригнічення росту грибів (рис. 3) та виявлені реакції наростання типів А і В (рис. 1, рис. 2 А, Б). Індекси пригнічення макроміцетів варіювалися від 38,9 до 51,1% і мікроміцета – від 54,4 до 77,7% (рис. 3). Слід відзначити майже однаковий відсоток пригнічення *F. pinicola* і *Mucor* sp. IFBG 139. У аналогічних експериментах виявлені індекси пригнічення від 30,7 до 98,3% за умови одночасного росту в культурі *Sphaeropsis sapinea* (*Diplodia pinea*) з



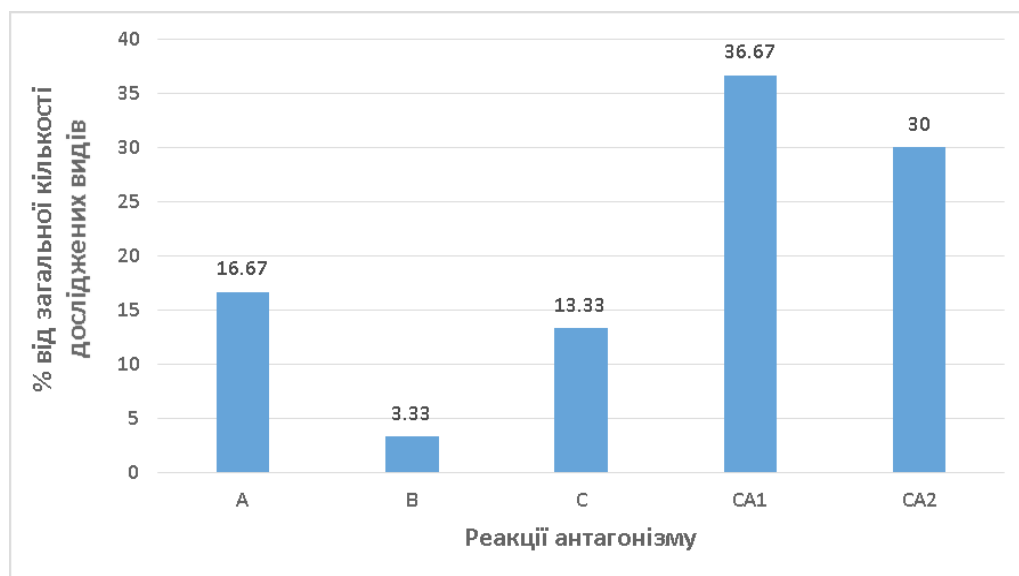


Рис. 1. Реакції антагонізму грибів: типи А і В – взаємне гальмування росту колоній при контакті та на дистанції, відповідно; С – спокійне наростання; підтипи  $C_{A1}$ ,  $C_{A2}$  – часткове та повне наростання після взаємного гальмування росту колоній при контакті, відповідно

Fig. 1. Reactions of fungal antagonism: types A and B are mutual deadlock at the contact and at the distance, C is overgrowth without deadlock; subtypes  $C_{A1}$  and  $C_{A2}$  are partial and complete overgrowth after deadlock at the mycelial contact

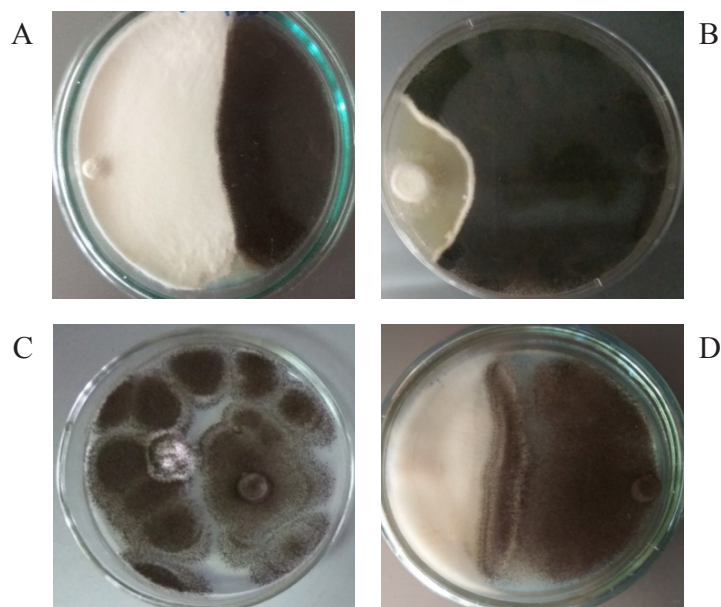


Рис. 2. Взаємовплив *Mucor* sp. IFBG 139 та макроміцетів: тип А (А) – *G. applanatum*, тип В (В) – *L. edodes*, підтип  $CA2$  (С) – *L. shimeji*, підтип  $CA1$  (D) – *Sch. commune*

Fig. 2. Mutual influence of *Mucor* sp. IFBG 139 and macromycetes: type A (A) – *G. applanatum*, type B (B) – *L. edodes*, subtype  $CA2$  (C) – *L. shimeji*, subtype  $CA1$  (D) – *Sch. commune*

*Armillaria* sp., *Bjerkandera adusta*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia* sp. [12] та від 26,7 до 67,1% при сумісному культивуванні *Verticillium* sp., *Pythium* sp. з *H. erinaceus*, *L. edodes*, *T. versicolor* [13].

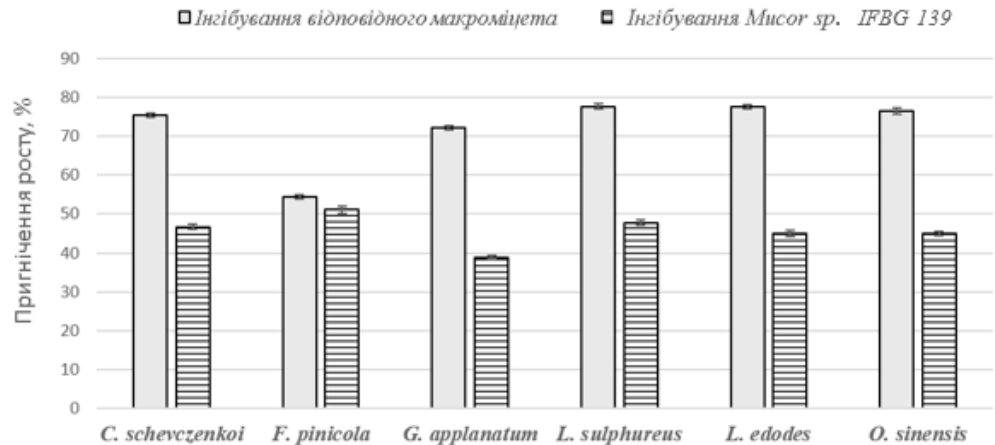


Рис. 3. Взаємне пригнічення росту грибів у подвійній культурі

Fig. 3. Mutual inhibition of fungal growth in dual culture

Взаємне гальмування росту колоній при контакті (тип А) виявлено для п'яти базидієвих видів: *G. applanatum*, *F. pinicola*, *L. sulphureus* (кислотрофів), *C. schevczenkoi* (підстилкового сапротрофу), *L. shimeji* (гумусового сапротрофу) та ентомофільного сумчастого гриба *O. sinensis* (рис. 3). Аналогічна взаємодія грибів встановлена при сумісному культивуванні мікроміцетів і кислотрофних базидієвих видів: *Bipolaris sorokiniana* і *Ganoderma adspersum*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. resinaceum*, *Trametes gibbosa* [1], *L. edodes*, [3]; *Clonostachys rosea* і *K. mutabilis*, *L. edodes*, *L. tigrinus*, *Lentinus brumalis*, *F. alnicola*, *P. cornucopiae*, *T. versicolor*; *Trichoderma* spp. і *C. squamosus*, *C. varius*, *Ganoderma* sp., *K. mutabilis*, *L. edodes*, *L. tigrinus*, *Hypholoma fasciculare*, *H. lateritium*, *F. alnicola*, *Sch. commune*, *T. versicolor* [4]; *F. culmorum* і *F. betulina*, *G. lucidum*, *L. sulphureus* [1]; *C. squamosus*, *C. varius*, *L. brumalis*, *T. versicolor* [1; 3]; *F. alnicola*, *P. cornucopiae* [3]; *F. oxysporum* і *G. lucidum*, *G. resinaceum*, *L. sulphureus*, *Panus neostrigosus*, *Trametes hirsuta* [1]; *G. tritici* і *G. adspersum*, *G. lucidum*, *T. gibbosa* [1], *K. mutabilis*, *Ph. populnea* [3]; *Pestalotiopsis funerea* і *F. fomentarius*, *G. adspersum*, *G. lucidum*, *G. resinaceum*, *L. tigrinus*, *Lentinus arcularius*, *M. giganteus*, *Panus neostrigosus*, *T. hirsuta*, *T. versicolor* [1]; *C. cereale* і *G. lucidum*, *G. resinaceum* [1], *C. squamosus* [1; 3], *F. velutipes*, *P. cornucopiae* [3]; *Verticillium dahliae* і *G. adspersum*, *F. betulina* [1]; *Aspergillus* sp. і *Trametes orchacea*; *Phythium* sp. і *Clitopilus scyphoides*, *Irpex lacteus*; *Fusarium* sp. і *C. scyphoides*, *I. lacteus*, *T. orchacea* [7].

В цілому, досліджені макроміцети проявили незначну антагоністичну активність проти досліджуваного *Mucor* sp. IFBG 139. Проте, інтерес може становити базидієвий кислотроф *L. edodes*. Для даного виду виявлено тип взаємодії В, візуально спостерігали наявність прозорої зони 5–8 мм (рис. 2 Б),



що свідчить про дифузію в агар антифунгальних речовин, здатних не тільки пригнічувати ріст мікроміцета, але й стримувати його ріст на відстані. Слід також звернути увагу на утворення безбарвного міцелію *Mucor sp.* IFBG 139 у формі незначного валика навпроти колонії *L. edodes*. Отримані дані свідчать про можливість розширення спектру застосування досліджуваного штаму *L. edodes* у сучасній біотехнології та фармакології, після відповідних досліджень і тестів.

Взаємне гальмування росту колоній на дистанції було виявлено при сумісному культивуванні *L. edodes* та *Verticillium sp.*, *Pythium sp.* та встановлено виділення рідини блискучого золотистого кольору на краях колоній грибів [13], а також при сумісному культивуванні ряду макроміцетів і мікроміцетів: *L. brumalis* з *B. sorokiniana*, *C. cereale*, *G. tritici*; *F. betulina* з *B. sorokiniana*; *L. arcularius* з *Ophiostoma ulmi*; *G. applanatum* з *Pestalotiopsis funerea* [1]; *Hypholoma lateritium* з *C. cereale*, *C. rosea*, *G. tritici* [3; 4]; *C. squamosus*, *Ph. populnea* з *C. rosea* [4].

Таким чином, результати проведених досліджень поповнюють існуючу інформацію про антагоністичні властивості грибів. При сумісному культивуванні 30 досліджених макроміцетів та мікроміцета *Mucor sp.* IFBG 139 виявлено різні реакції антагонізму: взаємне гальмування росту колоній при контакті (тип А), на дистанції (тип В), спокійне наростання без затримки росту гриба (тип С), а також часткове та повне наростання після взаємного гальмування росту колоній при контакті (підтипи  $C_{A1}$ ,  $C_{A2}$ ). Макроміцети проявили незначну антагоністичну активність проти *Mucor sp.* IFBG 139. Слід звернути увагу на здатність *Mucor sp.* IFBG 139 пригнічувати ріст грибів різних екологічних груп (ксилотрофів, гумусових та підстилкового сапротрофів та ентомофілів). Встановлено односторонній антагонізм *Mucor sp.* IFBG 139 проти більшості макроміцетів (24 видів), який був представлений типом С (4 види) та підтипами  $C_{A1}$  (11 видів) і  $C_{A2}$  (9 видів) та двосторонній антагонізм (5 видів тип А і 1 вид тип В) у разі сумісного культивування п'яти базидієвих видів грибів та одного сумчастого виду. Індекси взаємного пригнічення макроміцетів варіювалися від 38,9 до 51,1% і мікроміцета – від 54,4 до 77,7%. З 30 досліджених видів грибів здатність пригнічувати ріст *Mucor sp.* IFBG 139 виявлена для ксилотрофних базидієвих видів *C. schevczenkoi*, *F. pinicola*, *G. applanatum*, *L. shimeji*, *L. sulphureus* та сумчастого виду *O. sinensis*. Максимальний індекс пригнічення росту *Mucor sp.* IFBG 139 встановлено при сумісному рості з *F. pinicola*. Також виявлено вид *L. edodes*, який здатен продукувати метаболіти з антифунгальною дією, які здатні пригнічувати ріст *Mucor sp.* на відстані. Ці два види ксилотрофних базидієвих грибів можуть бути біотехнологічними об'єктами для подальших досліджень з метою вивчення їх антифунгальних речовин й розробки потенційно ефективної фунгіцидної продукції.

Т. А. Круподорова, В. Ю. Барштейн

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»,  
ул. Осиповского, 2А, г. Киев, 04123, Украина, тел.: +38(067)5088659,  
e-mail: barmash14@gmail.com

## АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МАКРОМИЦЕТОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К *MUCOR SP.* IFBG 139

### Реферат

**Цель.** Провести скрининг макромицетов на способность проявлять антагонистическую активность против микромицета *Mucor sp.* IFBG 139. **Методы.** Антагонистическую активность представителей 30 видов макромицетов по отношению к *Mucor sp.* IFBG 139 определяли методом двойных культур. **Результаты.** Исследованные макромицеты проявили незначительную антагонистическую активность в отношении выбранного штамма *Mucor sp.* IFBG 139. Установлено, что *Mucor sp.* IFBG 139 угнетает ряд видов макромицетов: спокойное нарастание по отношению к 4 видам, частичное – 11 видам и полное – 9 видам. Для определенных видов выявлен взаимный антагонизм, ингибирование макромицетов варьировалось от 38,9 до 51,1%, а микромицета – от 54,4 до 77,7%. Взаимное угнетение роста колоний при контакте наблюдали у 5 базидиальных видов: *Crinipellis schevczenkoi*, *Fomitopsis pinicola* (одинаковый уровень ингибирования), *Ganoderma applanatum*, *Laetiporus sulphureus*, *Lyophyllum shimeji* и аскомицета *Ophiocordyceps sinensis*. **Выводы.** Результаты проведенных исследований дополняют данные об антагонизме грибов. Максимальный индекс ингибирования роста *Mucor sp.* IFBG 139 установлен при совместном культивировании с *F. pinicola*. Гриб *Lentinula edodes* способен сдерживать рост микромицета, продуцируя метаболиты с антифунгальным действием против *Mucor sp.* IFBG 139. Эти два вида ксилотрофных базидиомицетов могут быть биотехнологическими объектами для дальнейших исследований с целью изучения их антифунгальных веществ и создания потенциально эффективных фунгицидных продуктов.

*Ключевые слова:* макромицеты, *Mucor sp.* IFBG 139, антагонизм, антифунгальная активность

Т. А. Krupodorova, V. Yu. Barshteyn

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of  
Ukraine, Osipovskogo 2a, 04123, Kyiv, Ukraine, tel.: +38(067)5088659,  
e-mail: barmash14@gmail.com

## ANTAGONISTIC ACTIVITY OF MACROMYCETES AGAINST *MUCOR SP.* IFBG 139

### Summary

**Aim.** To screen macromycetes for their ability to show antagonistic activity against *Mucor sp.* IFBG 139 micromycete. **Methods.** Antagonistic activity of the representatives of 30 macromycetes against *Mucor sp.* IFBG 139 has been





determined by the method of dual cultures. **Results.** The studied macromycetes showed low antagonistic activity against to the selected strain of *Mucor sp.* IFBG 139. The domination of unilateral antagonism of *Mucor sp.* IFBG 139 has been established: overgrowth of micromycete without deadlock was noted on 4 species, partial and complete overgrowth after deadlock at the mycelial contact was found on 11 species, on 9 species, respectively. Bilateral antagonism has been revealed for certain species, inhibition of macromycetes varied from 38.9 to 51.1%, and for micromycete from 54.4 to 77.7%. Mutual deadlock at the contact was observed for 5 basidiomycetes species: *Crinipellis schevczenkoi*, *Fomitopsis pinicola* (the same level of inhibition has been established), *Ganoderma applanatum*, *Laetiporus sulphureus*, *Lyophyllum shimeji*) and ascomycete *Ophiocordyceps sinensis*. **Results.** The obtained data supplement information about antagonism of the studied fungi species. Maximal inhibition index of *Mucor sp.* IFBG 139 growth has been found with *F. pinicola* co-cultivation. *Lentinula edodes* inhibit the growth of micromycete, producing antifungal metabolites against *Mucor sp.* IFBG 139. These two xylophilic basidiomycete species can be a biotechnological objects for further research in order to study their antifungal substances and to create a potentially effective fungicidal products.

*Key words:* Macromycetes, *Mucor sp.* IFBG 139, antagonism, antifungal activity

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бадалян С. М., Гарибян Н. Г. Антифитопатогенная активность мицелия полипоровых грибов (Agaricomycetes, Polyporales) // Современная микология в России. – 2017. – № 7. – С. 207–208.
2. Aigner M., Lass-Flörl C. Clinical Syndromes: Mucormycosis: A Practical Approach / In book: Clinically Relevant Mycoses. – 2019. – P. 91–100. [[https://doi.org/10.1007/978-3-319-92300-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92300-0_6)].
3. Badalyan S. M., Innocenti G., Garibyan N. G. Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture // Phytopathol. Mediterranea. – 2002. – 41, № 3. – P. 220–225.
4. Badalyan S. M., Innocenti G., Garibyan N. G. Interactions between xylophilic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments // Phytopathol. Mediterranea. – 2004. – 43, № 3. – P. 44–48.
5. Badalyan S. M., Isikhuemhen O. S., Garibyan N. G. Antagonistic/antifungal activities of medicinal mushroom *Pleurotus tuberregium* (Fr.) Singer (Agaricomycetidae) against selected filamentous fungi // Int. J. Med. Mushrooms. – 2008. – 10, № 2. – P. 155–162.
6. Bisko N. A., Lomberg M. L., Mytropolska N. Yu., Mykchaylova O. B. The IBK Mushroom culture collection. – K.: Alterpres, 2016. – 120 p.
7. Chaudhary R., Tripathi A. Interactions between mushrooms and fungi in dual-culture experiments // Int. J. Adv. Res. – 2016. – 4, № 6. – P. 482–493.
8. Greenberg R. N., Scott L. J., Vaughn H. H., Ribes J. A. Zygomycosis (mucormycosis): emerging clinical importance and new treatments// Current Opinion in Infectious Diseases. – 2004. – № 17. – P. 517–525.
9. Ibrahim A. S., Spellberg B., Walsh T. J., Kontoyiannis D. P. Pathogenesis of Mucormycosis// Clin. Infect. Dis. – 2012. – 54(S1) . – 16–22



10. Lewis R. E., Lortholary O., Spellberg B., Roilides E., Kontoyiannis D. P., Walsh T. J. How Does antifungal pharmacology differ for mucormycosis versus aspergillosis? // *Clin. Infect. Dis.* – 2012. – № 54. – P. 67–72.
11. Morin-Sardin S., Nodet P., Coton E., Jany J.-L. *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications// *Fungal Biology Reviews.* – 2017. – 31(1) . – 12–32.
12. Oliveira C. F. de, Moura P. F., Rech, K. S., Oliveira C.S.P. de, Konopatzki Hirota B. C., Oliveira M. de, Silva C. B. da, Souza A. M. de, Gaspari Dias J. F., Miguel O. G., Auer C. G., Miguel, M. D. Antagonistic activity of *Diplodia pinea* against phytopathogenic fungi // *Folia Microbiologica.* – 2018. [<https://doi.org/10.1007/s12223-018-00667-y>].
13. Owaïd M. N. Antagonistic role of hypha and cell-free culture filtrates of medicinal mushrooms to *Verticillium* sp. and *Pythium* sp. fungal pathogens // *Current Research in Environmental & Applied Mycology.* – 2017. – 7(2). – P. 94–102.
14. Ribes J. A., Vanover-Sams C. L., Baker D. J. Zygomycetes in human disease // *Clinical Microbiology Reviews.* – 2000. – № 13. – P. 236–301.
15. Rogers T. R. Treatment of zygomycosis: current and new options // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2008. – № 61. – P. 35–39.
16. Vincent J. M. Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors // *Nature.* – 1947. – № 159. – 850 p. [<https://doi.org/10.1038/159850b0>].

### References

1. Badalyan SM, Garibyan NG. Antiphytopathogenic activity of the mycelia of polypore fungi (Agaricomycetes, Polyporales)// *Modern Mycology in Russia.* – 2017. – 7. – P. 207–208. (in Russian)
2. Aigner M, Lass-Flörl C. Clinical Syndromes: Mucormycosis: A Practical Approach / In book: *Clinically Relevant Mycoses.* – 2019. – P. 91–100. [[https://doi.org/10.1007/978-3-319-92300-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92300-0_6)].
3. Badalyan S.M, Innocenti G, Garibyan NG. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture // *Phytopathol. Mediterranea.* – 2002. – 41, № 3. – P. 220–225.
4. Badalyan SM, Innocenti G, Garibyan NG. Interactions between xylotrophic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments // *Phytopathol. Mediterranea.* – 2004. – 43, № 3. – P. 44–48.
5. Badalyan SM, Isikhuemhen OS, Garibyan NG. Antagonistic/antifungal activities of medicinal mushroom *Pleurotus tuberregium* (Fr.) Singer (Agaricomycetidae) against selected filamentous fungi // *Int. J. Med. Mushrooms.* – 2008. – 10, № 2. – P. 155–162.
6. Bisko NA, Lomberg ML, Mytropolska NYu, Mykchaylova OB. The IBK Mushroom culture collection. – K.: Alterpres, 2016. – 120 p.
7. Chaudhary R, Tripathi A. Interactions between mushrooms and fungi in dual-culture experiments // *Int. J. Adv. Res.* – 2016. – 4, № 6. – P. 482–493.
8. Greenberg RN, Scott LJ, Vaughn HH, Ribes JA. Zygomycosis (mucormycosis): emerging clinical importance and new treatments// *Current Opinion in Infectious Diseases.* – 2004. – № 17. – P. – 517–525.



9. Ibrahim AS, Spellberg B, Walsh T.J, Kontoyiannis DP. Pathogenesis of Mucormycosis// Clin. Infect. Dis. – 2012. – 54(S1) . –16–22

10. Lewis RE, Lortholary O, Spellberg B, Roilides E, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. How Does antifungal pharmacology differ for mucormycosis versus aspergillosis? // Clin. Infect. Dis. – 2012. – № 54. – P. 67–72.

11. Morin-Sardin S, Nodet P, Coton E, Jany J-L. Mucor: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications// Fungal Biology Reviews. – 2017. – 31(1) . – 12–32

12. Oliveira CF de, Moura PF, Rech KS, Oliveira CSP de, Konopatzki Hirota BC, Oliveira M de, Silva CB da, Souza AM de, Gaspari Dias JF, Miguel OG, Auer CG, Miguel, MD. Antagonistic activity of *Diplodia pinea* against phytopathogenic fungi. Folia Microbiologica. – 2018. [<https://doi.org/10.1007/s12223-018-00667-y>].

13. Owaid MN. Antagonistic role of hypha and cell-free culture filtrates of medicinal mushrooms to *Verticillium* sp. and *Pythium* sp. fungal pathogens // Current Research in Environmental & Applied Mycology. – 2017. – 7(2). – P. 94–102.

14. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease // Clinical Microbiology Reviews. – 2000. – № 13. – P. 236–301.

15. Rogers TR. Treatment of zygomycosis: current and new options // J. Antimicrob. Chemother. – 2008. – № 61. – P. 35–39.

16. Vincent JM. Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors // Nature. – 1947. – № 159. – 850 p. [<https://doi.org/10.1038/159850b0>].

Стаття надійшла до редакції 10.05.2019 р.



**І. Д. Жунько, Г. І. Жумінська**

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

## СКРИНІНГ ПРОДУЦЕНТІВ СИДЕРОФОРІВ СЕРЕД ШТАМІВ *PANTOEA AGGLOMERANS*

**Метою** роботи було проведення скринінгу штамів-продуцентів сидерофорів серед бактерій *P. agglomerans*. **Методи.** Здатність до утворення сидерофорів штамми *P. agglomerans* досліджували за допомогою хромазуrol S (CAS)-аналізу. Як індикатор використовували трикомпонентний комплекс: хромазуrol S, залізо (III) та гексадецилтриметиламоній бромід (HDTMA). Продукцію сидерофорів визначали на підставі якісної оцінки утилізації заліза на CAS-агарі. Результати. Бактерії, які були здатні синтезувати сидерофори, поглинали йони заліза (III) з поживного середовища залежно від інтенсивності продукції даних метаболітів. В результаті скринінга, 63,2 % бактеріальних штамів показали високу здатність до продукції досліджуваних речовин. **Висновки.** Відібрані штами *P. agglomerans* можуть бути використані в подальших біотехнологічних дослідженнях.

**Ключові слова:** *Pantoea agglomerans*, скринінг, сидерофори, CAS-аналіз, Fe<sup>3+</sup>.

Майже 20 видів бактерій, представників родини *Enterobacteriaceae*, відносяться до роду *Pantoea*. Ізоляти цих бактерій з води та ґрунту використовуються для промислових цілей, фіксують азот та сприяють росту рослин, що може бути корисно для сільськогосподарського застосування [7]. Деякі ізоляти є продуцентами антибіотичних речовин і агентами біоконтролю збудників хвороб рослин [3, 7].

На сьогодні одним із найбільш перспективних є вид *P. agglomerans*, так як штами даного мікроорганізму можуть бути антагоністами фітопатогенів, мають антибактеріальну та антифунгальну активність, здатні до конкуренції при колонізації рослин [10], тому препарати на основі *P. agglomerans* застосовуються проти збудника бактеріального опіку яблуні та груші – *Erwinia amylovora*, та інших бактеріозів [1].

Вивчення антибактеріальних властивостей метаболітів *P. agglomerans* може суттєво сприяти у вирішенні актуальних проблем сільського господарства. Важливий механізм пригнічення фітопатогенів полягає в конкуренції за джерела живлення. Ефективним засобом в ній є бактеріальні сидерофори, низькомолекулярні речовини, які хелатують йони Fe<sup>3+</sup>, та транспортують їх в клітину. Сучасні дослідження дозволяють стверджувати, що залізо є універсальним фактором, що обмежує ріст мікроорганізмів. Тому в процесі еволю-



ції винайшли засоби отримання заліза в умовах його дефіциту в середовищі, що значно підвищило їх конкурентоспроможність у відносинах з іншими бактеріями [4, 11]. Таким чином, антибактеріальний ефект досягається завдяки зниженню вмісту доступного заліза, що обмежує здатність патогенів до розмноження [5, 9]. Відомо, що більшість аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів синтезують хоча б один сидерофор [4, 8].

Метою даної роботи було проведення скринінгу штамів-продуцентів сидерофорів серед бактерій *P. agglomerans*.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження слугували 19 штамів бактерій *P. agglomerans*, отримані з музею кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова (25(1)1, 1В В., 1О., 1, 1І, 1ІІ, 1ІV, 1V, 1VI, 9/7(O)2yellow, 9/7(O)2white, 4O white, 4Oyellow) та з колекції Інституту мікробіології і вірусології НАН України імені Д.К. Заболотного (9/7-2, g150white, g150yellow, g157, g157/RI, 28/2-1). «Yellow» в назві штаму означає, що бактеріальні колонії даного штаму набувають яскраво жовтого кольору при 3–5-добовому культивуванні при освітленні. «White» – означає, що колонії депігментовані. Як контроль на наявність сидерофорів використано виділений з рослин штам *Bacillus megaterium* ONU 484 (колекція ОНУ імені І. І. Мечникова) оскільки він є активним продуцентом даних метаболітів і успішно використовується в дослідженнях [2].

Всі штами зберігалися в середовищі Лурія-Бертані (LB) при 4 °С та -80 °С. Для вирощування бактерій використовували рідкі та агаризовані живильні середовища LB, г/л: триптон – 10, дріжджовий екстракт – 5, NaCl – 10. Агаризовані живильні середовища містили 1,5% та 0,7% агар-агару.

Добову культуру готували шляхом перенесення одиночної бактеріальної колонії *P. agglomerans* з чашки Петрі в 5 мл LB-середовища та інкубували при температурі 28 °С протягом 24 годин з інтенсивною аерацією з використанням шейкера-інкубатора New Brunswick Innova®43 (Німеччина).

Бактеріальні штами *P. agglomerans* перевіряли на здатність продукувати сидерофори за допомогою універсального CAS-аналізу [12]. Використовували набір реагентів фірми ACROS ORGANICS (Індія). Послідовно в скляних колбах готували наступні розчини: А: розчиняли 0,0605 г хромазурила S у 50 мл дистильованої H<sub>2</sub>O; Б: розчиняли 0,0027 г 1мМ FeCl<sub>3</sub>·x6 H<sub>2</sub>O у 10 мл 10 мМ HCl; В: розчиняли 0,073 г гексадецилтриметиламоній броміда у 40 мл дистильованої H<sub>2</sub>O.

Розчин А змішували з 10 мл розчину Б, потім отриману суміш додавали при постійному струшуванні до розчину В. Отриманий розчин (100 мл) синього кольору автоклавували при 0,5 атм протягом 30 хв, додавали до 900 мл автоклавованого середовища LB з рН 6,8 та розливали в стерильні чашки Петрі. Після цього додавали 5мл добової культури в центр чашки Петрі і залишали на 5–10 хв у ламінарному боксі для підсихання крапель. Культивування проводили при температурі 28 °С впродовж 5–7 діб [12].

Експеримент проводили у трьох повторях, результати обробляли статистично з використанням пакета програм Microsoft Excel 2010. Продукцію сиде-



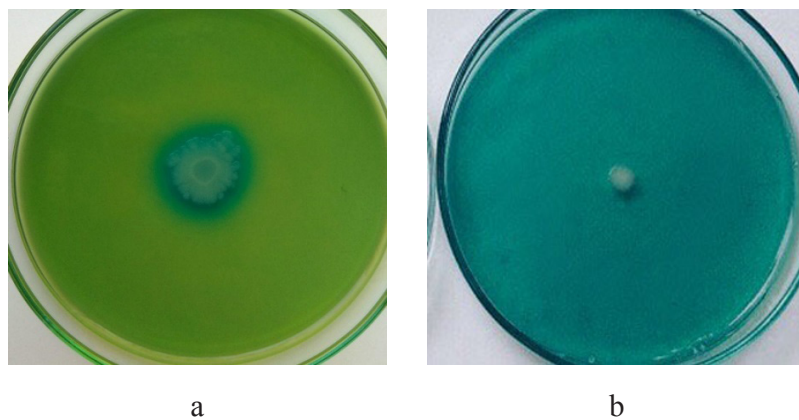
рофорів визначали на підставі якісної оцінки утилізації заліза на CAS-агарі.

Концентрацію клітин у суспензіях досліджуваних культур бактерій вимірювали за допомогою спектрофотометра Bio-Rad «Smart Spec™ Plus» (США) при довжині хвилі 600 нм.

### Результати та їх обговорення

Відомо, що бактерії *P. agglomerans* здатні продукувати широкий спектр метаболітів, у тому числі сидерофори, основна функція яких полягає в переведенні заліза, пов'язаного з білками або водонерозчинними сполуками, в доступну для мікроорганізмів йонну форму  $Fe^{3+}$  [6, 11]. У грамнегативних бактерій, в тому числі *P. agglomerans*, комплекс сидерофор- $Fe^{3+}$  повинен подолати зовнішню мембрану клітинної стінки і цитоплазматичну мембрану. Для перенесення цього комплексу через мембрану грамнегативні бактерії мають спеціалізовані білки-рецептори, що зв'язують комплекс сидерофор- $Fe^{3+}$  і здійснюють його активний транспорт в периплазматичний простір проти градієнта концентрації [4, 8].

Проаналізувавши літературні [11, 12] та одержані дані можна стверджувати, що бактерії, які здатні синтезувати сидерофори, поглинають йони заліза з живильного середовища та змінюють його колір з синього на жовтий (рис. 1) залежно від інтенсивності продукції даних метаболітів. Зміна кольору CAS-агару відбувається за рахунок зв'язування хелатувильними агентами йонів  $Fe^{3+}$ , що викликає перекомплексування та вивільнення хромазурулу S.



**Рис. 1. Колонії *P. agglomerans* на CAS-агарі**  
 а) штамп *P. agglomerans* I – зміна кольору CAS-агару за рахунок утилізації заліза бактеріями ; б) штамп *P. agglomerans* 9/7(O)2yellow – не продукує сидерофорів, колір CAS-агару не змінюється

**Fig. 1. *P. agglomerans* bacteria colonies on CAS-agar:**  
 а) Strain *P. agglomerans* I – color change of CAS-agar due to the iron utilization by bacteria; б) Strain *P. agglomerans* 9/7(O)2yellow – does not produce siderophores (the color of CAS-agar is not changed)

Колонії штаму *B. megaterium* ONU 484, який було використано як позитивний контроль, змінювали колір CAS-агару за рахунок продукції сидеро-

форів і утилізації заліза. Контрольний зразок з CAS середовищем мав яскраво синє забарвлення.

Перші ознаки наявності сидерофорів в середовищі спостерігалися вже на третю добу від початку експерименту. З даних, наведених в таблиці 1, видно, що здатність штамів *P. agglomerans* продукувати ці метаболіти варіює. Концентрації клітин становили  $1,22 \times 10^9 \pm 0,32$  –  $2,00 \times 10^9 \pm 0,01$  кл/мл (табл. 1).

Таблиця 1

Якісна оцінка продукування сидерофорів штамми *P. agglomerans* за допомогою CAS-аналізу

Table 1

Qualitative estimation of siderophore production of *P. agglomerans* strains by CAS-assay

Штам <i>P. agglomerans</i>	Концентрація клітин, $\times 10^9$ /мл	Результати CAS-тесту
9/7-2	1,62±0,07	++
g150white	1,41±0,27	++
g150yellow	1,49±0,26	+++
g157	1,54±0,28	++
g157/RI	1,22±0,32	++
28/2-1	1,94±0,06	+++
25(1)1	1,48±0,18	+
1O	1,93±0,08	+++
IB B.	1,61±0,13	+++
4Owhite	2,00±0,01	+++
4Oyellow	1,65±0,15	+++
9/7(O)2yellow	1,37±0,11	–
9/7(O)2white	1,94±0,09	+++
I	1,48±0,11	+++
II	1,41±0,04	+++
III	1,51±0,34	++
IV	1,50±0,29	+++
V	1,65±0,01	+++
VI	1,72±0,18	+++

Примітка: Дані представлені середнім значенням  $\pm$  стандартне відхилення, n=3. Висока продукція сидерофорів (+++), середня продукція сидерофорів (++) , низька продукція сидерофорів (+), відсутність продукції сидерофорів (-).

Note: Data are represented by the mean  $\pm$  standard deviation, n=3. High siderophore production (+++), medium siderophore production (++) , low siderophore production(+), no siderophore production (-).

В процесі дослідження визначено, що максимальну здатність до виробництва сидерофорів показали 63,2% штамів *P. agglomerans* (рис. 1a), 26,3% штамів синтезували дані сполуки на середньому рівні та лише у штаму *P. agglomerans* 25(1)1, спостерігався низький рівень продукції сидерофорів



(табл.1). Бактерії штаму *P. agglomerans* 9/7(O)2yellow виявилися взагалі нездатним до синтезу сидерофорів (рис. 2b)/

Слід зазначити, що здатність до синтезу сидерофорів бактеріями *P. agglomerans* значно підвищує їх конкурентоспроможність у відносинах з іншими мікроорганізмами. Зв'язування заліза сидерофорами *P. agglomerans* призводить до дефіциту заліза, що в свою чергу, обмежує чисельність та пригнічує ріст патогенів рослин. Отже можна припустити, що дані сполуки здатні сприяти прояву антагоністичних властивостей цих бактерій. Застосування штамів даних мікроорганізмів може бути найбільш ефективним у періоди активного поширення інфекції бактеріального опіку плодівих – під час цвітіння і при появі на уражених частинах рослин ексудату. Так можна знизити поширення збудника, а також зменшити ураження зав'язі, що позитивно вплине на врожайність [10].

Використання *P. agglomerans* зростає завдяки виявленню нових штамів даних бактерій, які є все більш ефективними в боротьбі з патогенними мікроорганізмами. З літератури відомо про штам *P. agglomerans* lma2, бактерії якого є активними продуцентами сидерофорів та низки інших речовин, і який успішно застосовується в аграрній сфері [13]. Таким чином, в результаті скринінгових досліджень показано, що штами *P. agglomerans* (g150yellow, 28/2-1, 10., ІВ В., 4Owhite, 4Oyellow, 9/7(O)2white, I, II, IV, V, VI) з високою здатністю до синтезу сидерофорів, можуть бути перспективними для подальших досліджень з розробки біопрепаратів біологічного контролю фітопатогенних бактерій.

**И. Д. Жунько, А. И. Жуминская**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одеса, 65082, Украина,  
тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: zhunkinn@gmail.com

## СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ СИДЕРОФОРОВ СРЕДИ ШТАММОВ *PANTOEA AGGLOMERANS*

### Реферат

*Целью работы было проведение скрининга штаммов-продуцентов сидерофоров среди бактерий *P. agglomerans*. Методы. Способность к образованию сидерофоров штаммами *P. agglomerans* исследовали с помощью хромазурол S (CAS)-анализа. В качестве индикатора использовали трехкомпонентный комплекс: хромазурол S, железо (III) и гексадецилтриметиламмоний бромид (НДТМА). Продукцию сидерофоров определяли на основании качественной оценки утилизации железа в CAS-агаре. Результаты. Бактерии, которые были способны синтезировать сидерофоры, поглощали ионы железа (III) с питательной среды в зависимости от интенсивности продукции данных метаболитов. В результате скрининга 63,2% бактериальных штаммов показали высокую способность к продукции данных веществ. Выводы. Отобранные штаммы могут быть использованы в дальнейших биотехнологических исследованиях.*

*Ключевые слова: *Pantoea agglomerans*, скрининг, сидерофоры, CAS-анализ, Fe<sup>3+</sup>.*





**I. D. Zhunko, G. I. Zhuminska**

Odessa I. I. Mechnikov National University,  
2, Dvoryanska str., Odessa, 65082, Ukraine,  
tel.: +38 (0482) 68 79 64; e-mail: zhunkinn@gmail.com

## SCREENING OF SIDEROPHORE PRODUCERS AMONG *PANTOEA AGGLOMERANS* STRAINS

### Summary

**Aim.** Screening of siderophore-producing strains of *P. agglomerans*. **Methods.** The siderophore-producing ability of *P. agglomerans* strains have been investigated by using of chrome azurol S (CAS) assay. The ternary complex of chrome azurol S, iron(III), hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (HDTMA) was used as an indicator. Siderophore production was determined by qualitative estimation of iron utilization in CAS-agar. **Results.** Bacteria able to synthesize siderophores uptook iron ions (III) from the nutrient medium depending on the intensity production of these metabolites. As a result of screening, 63.2% of the bacterial strains showed high ability to synthesize of these substances. **Conclusions.** Selected strains can be used in further biotechnological research.

*Key words:* *Pantoea agglomerans*, screening, siderophores, CAS assay,  $Fe^{3+}$ .

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Булигіна Т. В., Варбанець Л. Д., Пасічник Л. А., Житкевич Н. В. Резистентність до антимікробних препаратів бактерій *Pantoea agglomerans* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2016. – № 1. – С. 68–75.
2. Зацінська О. С. Мікробні сидерофори як можливі фактори антагонізму бактерій *Vacillus megaterium* щодо патогенних *Agrobacterium spp.* // Збірка матеріалів наукового товариства студентів, аспірантів і молодих учених. – Одеса: Репозитарій наукової бібліотеки ОНУ імені І. І. Мечникова, 2019. – С. 17–18.
3. Іваниця Т. В., Страшнова І. В., Смальчук Д. С. Загальна характеристика бактерій роду *Pantoea* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2018. – № 3. – С. 6–25.
4. Леонов В. В., Миронов, А. Ю., Ананьїна І. В., Рубальская Е. Е., Сентюрлова Л. Г. Микробные сидерофоры: строение, свойства и функции // Астраханский медицинский журнал. – 2016. – Т. 11, № 4. – С. 24–37.
5. Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia L. M. Plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents // Genet. Mol. Biol. – 2012. – V. 35. – P. 1044–1051.
6. Berner I., Konetschny-Rapp S., Jung G., Winkelmann G. Characterization of ferrioxamine E as the principal siderophore of *Erwinia herbicola* (*Enterobacter agglomerans*) // Biology of Metals. 1988 – V. 1, № 1. – P. 51–56.
7. Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Kinga Lemieszek M., Golec M., Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2016. – V. 23, № 2. – P. 197–205.
8. Neilands J. B. Siderophores: Structure and function of microbial iron



- transport compounds // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270, № 45. – P. 26723–26726.
9. Parmar H. Y., Chakraborty H. Effect of siderophore on plant growth promotion // Int. J. Appl. Pure. Sci. Agric. – 2016. – V. 2, № 3. – P. 60–68.
  10. Poppe L., Vanhoutte S., Hofte M. Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA – 2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits // European Journal of Plant Pathology. – 2003. – V. 109, N 9. – P. 963–973.
  11. Raymond K. N., Allred B. E., Sia A. K. Coordination chemistry of microbial iron transport // Acc. Chem. Res. – 2015. – V. 48. – P. 2496–2505.
  12. Schwyn B., Neilands J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore // Analytical Biochemistry – 1987. – V. 160. – P. 47–56.
  13. Silini-Cherif H, Silini A, Ghoul M, Yadav S. Isolation and characterization of Plant Growth Promoting traits of a Rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* lma2. Pakistan Journal of Biological Sciences – 2012. – V. 15. – P. 267–276.

### References

1. Bulyhina TV, Varbanets LD, Pasichnyk LA, Zhitkevych NV. Antibiotic resistance of *Pantoea agglomerans* // Microbiology and Biotechnology. 2016;(1):68–75. Ukrainian.
2. Zashchynska OS. Microbial siderophores as possible antagonism factors of *Bacillus megaterium* bacteria against pathogenic *Agrobacterium* spp. In: Proceedings of Scientific Society of students, PhD students and young scientists, Odessa: Repository of ONU I.I. Mechnikov, 2019:17–18. Ukrainian.
3. Ivanytsia TV, Strashnova IV, Smalchuk DS. Characteristics of bacterial genus *Pantoea* // Microbiology and Biotechnology. 2018;(3):6–25. Ukrainian.
4. Leonov VV, Mironov AYU, Anan'ina IV, Rubalskaya EE, Sentyurova LG. Siderophores of microbes: structure, properties and functions // Astrakhan Medical Journal. 2016;11(4):24–37. Russian.
5. Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LM. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents // Genet Mol Biol. 2012;(35):1044–1051.
6. Berner I, Konetschny-Rapp S, Jung G, Winkelmann G. Characterization of ferrioxamine E as the principal siderophore of *Erwinia herbicola* (*Enterobacter agglomerans*) // Biology of Metals. 1988;1(1):51–56.
7. Dutkiewicz J, Mackiewicz B, Kinga Lemieszek M, Golec M, Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 2016;23(2):197–205.
8. Neilands JB. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds // J Biol Chem. 1995;270(45):26723–26726.
9. Parmar HY, Chakraborty H. Effect of siderophore on plant growth promotion // Int J Appl Pure Sci Agric. 2016;2(3):60–68.
10. Poppe L, Vanhoutte S, Hofte M. Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA – 2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits // European Journal of Plant Pathology. 2003;109(9):963–973.
11. Raymond KN, Allred BE, Sia AK. Coordination chemistry of microbial



iron transport // *Acc Chem Res.* 2015;(48):2496–2505.

12. Schwyn B, Neilands J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore // *Analytical Biochemistry.* 1987;(160):47–56.

13. Silini-Cherif H, Silini A, Ghoul M, Yadav S. Isolation and characterization of Plant Growth Promoting traits of a Rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* lma2. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2012;(15): 267–276.

Стаття надійшла до редакції 11.07.2019 р.



## ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

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

**Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:**

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

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

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

**При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:**

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



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

- Реферат англійською мовою:

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

- Повний текст статті мовою оригіналу.

**Текст статті має включати такі складові:**

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

До кожного примірника статті додається реферат мовою оригіналу статті (українською/російською) та англійською мовою.

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

- реферат має бути інформативним (не містити зайвих слів);
- структурованим, тобто містити розділи: мета; методи, що використані в роботі та/або методологія проведення досліджень; результати та сфера їх застосування; висновки;
- англійська версія реферату має бути написана якісною англійською мовою (за потреби доцільно користуватися послугами кваліфікованих спеціалістів-лінгвістів з подальшим науковим редагуванням тексту автором), з використанням термінології, яка використовується в англійськомовних медикобіологічних журналах, уникати використання термінів, які є прямою українською/російською калькою;
- компактним (200–250 слів);
- ключові слова (не більше 5-ти) розміщуються з абзацу після реферату.

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

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



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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то 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 компанії та країни-виробника.
- Одиниці вимірювання вказати в системі СІ.
- Концентрацію розчинів представляти в М, мМ, мкМ (молярна концентрація).
- Молекулярку масу (Мм) – Да (дальтони) або кДа.
- При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.
- Активність ферментів виражають в мкмолях використаного субстрату або утвореного продукту за 1 хв на 1 мг протеїну або використати стандартну одиницю активності U (IU) і катал (скорочено кат), питома активність ензиму виражається в ммоль/хв на 1 мг протеїну або в од.акт/мг, кат/кг.
- Вказати умови проведення ферментативної реакції (температура, рН, концентрація субстрату).
- Вказати використані методи статистичного аналізу, програму статистики.

Таблиці мають бути компактними, мати порядковий номер; графи, колонки мають бути точно визначеними логічно і графічно. Матеріал таблиць (як і рисунків) має бути зрозумілим і не дублювати текст статті. Цифровий матеріал таблиць слід опрацювати статистично.

Рисунки виконуються у вигляді чітких креслень (за допомогою комп'ютерного графічного редактора у форматі Word, TIF, JPG). Осі координат на графіках мають бути позначені. Рисунки розміщуються у тексті статті.

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

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



**Список використаної літератури**

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

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

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

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

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

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

Назви статей наводять англійською мовою.

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

**Зразки посилання літератури**

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

**На книги**

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

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

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

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

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

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

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

**На журнальні статті**

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

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



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

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

#### **На тези доповідей**

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

#### **На депоновані наукові роботи**

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

#### **На стандарти**

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

#### **На автореферати дисертацій**

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

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

##### **References**

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

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

##### **Статті в журналах:**

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

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

##### **Книги:**

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

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

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

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

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





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

**Диссертационные работы:**

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

**Сборники:**

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

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

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

**Патенти, заявки:**

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

**Статті з електронних журналів:**

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

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

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

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

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

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

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



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

Верстка С. О. Остапенко  
Підписано до друку 23.09.2019 р. Формат 70x100/16.  
Ум.-друк. арк. 7,31. Тираж 100 пр.  
Зам. № 1994.

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