

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал

Виходить 4 рази на рік

Засновано у липні 2006 року

№ 1 (37)
2017

Одеса
ОНУ
2017

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

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця (Одеса, Україна)

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О. Філіпова (Одеса, Україна)

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР

Т.В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

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

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

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

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

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

Завідувач редакцією Н.Г. Юргелайтіс

Редактори: Л.Б. Котлярова, І.В. Райко

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна. Тел.: +38 (048) 723-28-39,
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

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

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

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

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

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

З М І С Т

О Г Л Я Д О В І П Р А Ц І

Л.В. Капрельянц, Л.О. Крупицька ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ПРОПОНОВОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ	6
---	---

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

М.В. Бойко, М.В. Патика, Т.І. Патика ОЦІНКА ПРОДУКТИВНОСТІ <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> НА РІЗНИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩАХ	16
--	----

Г.О. Іутинська, Л.В. Титова, О.Г. Пінаєв, Є.Є. Андронов, С.В. Вознюк БІОРИЗНОМАНІТНІСТЬ МІКРОБІОМУ РИЗОСФЕРИ СОЇ ЗА ЗАСТОСУВАННЯ ФУНГЦИДІВ ТА ІНОКУЛЯЦІЇ МІКРОБНИМ ПРЕПАРАТОМ ЕКОВІТАЛ	23
--	----

А.Г. Мерліч, Н.В. Ліманська, І.Д. Жунько, Д.О. Бабенко ВПЛИВ <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ТА <i>BACILLUS ATROPHAEUS</i> НА ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ ТА РІСТ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ	36
--	----

В.В. Круть, Л.А. Данкевич ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ЛІПІДІВ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>BACILLUS</i>	48
---	----

Г.В. Ямборко, А.М. Остапчук, Ж.Ю. Сергєєва, Л.М. Пилипенко, І.В. Пилипенко ХЕМОТАКСОНОМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА ПЛАЗМІДНІ ПРОФІЛІ АЕРОБНИХ ТА ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЕРОБНИХ СПОРОУТВОРЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ З ОВОЧЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ	56
--	----

О.А. Дрегваль, А.О. Єременко, Н.В. Черевач, А.І. Вінніков АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ҐРУНТОВИХ СТРЕПТОМІЦЕТІВ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ТА ГРИБІВ	73
--	----

К.Д. Крилова, Ж.Ю. Сергєєва, О.В. Басюл АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ДО ЗБУДНИКА М'ЯКОЇ ГНИЛІ КОМПЛЕКСУ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ І КАРОТОВОРИЦИНІВ ЗА ЗБЕРІГАННЯ	85
---	----

П.П. Зелена, Г.В. Гладка, В.В. Шепелевич, Ю.М. Юмина, Н.В. Сенчило, Л.М. Сківка ЧУТЛИВІСТЬ ДО УЛЬТРАФІОЕТОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ГРАМНЕГАТИВНИХ ЕПІФІТНИХ БАКТЕРІЙ З ЗОНИ ВІДЧУЖЕННЯ ЧАЕС	94
--	----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	105
---	-----

АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2016 РОЦІ	112
--	-----

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

L.V. Kaprelyants, L.A. Krupitskaya PROBIOTIC PROPERTIES AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF PROPIONIC ACID BACTERIA.....	6
---	---

EXPERIMENTAL WORKS

M.V. Boyko, N.V. Patyka, T.I. Patyka ESTIMATION OF PRODUCTIVITY <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> ON DIFFERENT MEDIA	16
---	----

G.O. Iutynska, L.V. Tytova, O.G. Pinaev, E.E. Andronow, S.V. Vozniuk MICROBIOME BIODIVERSITY OF SOYBEAN RHIZOSPHERE UNDER APPLICATION OF FUNGICIDES AND INOCULATION BY MICROBIAL BIOFORMULATION ECOVITAL	23
--	----

A.G. Merlich, N.V. Limanska, I.D. Zhunko, D.O. Babenko EFFECT OF <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> AND <i>BACILLUS ATROPHAEUS</i> ON GERMINATION OF WHEAT SEEDS AND SEEDLINGS GROWTH	36
--	----

V.V. Krout, L.A. Dankevych GENUS <i>BACILLUS</i> ENTOMOPATHOGENIC STRAINS FATTY ACID LIPID COMPOSITION	48
---	----

G.V. Yamborko, A.M. Ostapchuk, Zh.Yu. Sergieieva, L.M. Pylypenko, I.V. Pylypenko CHEMOTAXONOMIC FEATURES AND PLASMID PROFILES OF AEROBIC AND FACULTATIVE ANAEROBIC SPORE-FORMING BACTERIA FROM VEGETABLES	56
---	----

O.A. Drehval, A.O. Yeremenko, N.V. Cherevach, A.I. Vinnikov ANTAGONISTIC ACTIVITY OF SOIL STREPTOMYCETES AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA AND FUNGI	73
--	----

K.D. Krylova, Zh. Yu. Sergeeva, O. V. Basiul ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE LACTIC ACID BACTERIA AND CAROTOVORICENES COMPLEX AGAINST THE SOFT ROT CAUSATIVE AGENT DURING THE STORAGE	85
---	----

P. Zelena, G. Gladka, V. Shepelevych, Iu. Yumyna, N. Senchylo, L. Skivka SENSITIVITY TO UV-C OF GRAMNEGATIVE EPIPHYTIC BACTERIA FROM CHERNOBYL EXCLUSION ZONE.....	94
---	----

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	105
------------------------------------	-----

ALPHABET INDEX OF PAPER PUBLISHED IN JOURNAL “MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY” IN 2016 YEAR	112
---	-----

УДК: [679.872+ 579.873. 1] : 57.083. 1

Л.В. Капрельянц, Л.А. Крупицкая

Одесская национальная академия пищевых технологий,
ул. Канатная, 112, Одесса, 65039, Украина, тел.: +38 (048) 712 41 12,
e-mail: krupitskaja.lora@yandex.ua

ПРОБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

*В статье приведены сведения научной литературы об физиологических и биохимических свойствах пропионовокислых бактерий, а также об их метаболической способности, что позволяет использовать пропионовокислые бактерии в роли препаратов и продуктов питания пробиотического назначения при дисбиотических нарушениях желудочно-кишечного тракта. Рассмотрен биотехнологический потенциал бактерий рода *Propionibacterium*, которому, с точки зрения конструирования эффективного био корректора, недостаточно уделено внимания.*

Ключевые слова: пробиотик, нормобиота, молочнокислые продукты, пропионовокислые бактерии, пропионовая кислота.

В настоящее время, для восстановления нормобиоты желудочно-кишечного тракта человека, применяют пробиотические препараты, содержащие живые микроорганизмы [7].

Согласно классическому определению, пробиотики – это живые микроорганизмы, использование которых в необходимом количестве оказывает лечебно профилактическое действие на организм человека, нормализуя его кишечную микробиоту [6, 12].

При этом пробиотический препарат должен состоять из микроорганизмов, которые являются облигатными представителями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека. Это, преимущественно, бактерии из родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Propionibacterium* [4, 9].

Несмотря на убедительные данные, свидетельствующие о постоянном присутствии пропионовокислых бактерий (ПКБ) в различных биотопах человека [2, 5], исследований, которые посвящены физиологической значимости данной группы прокарриот, как одного из наиболее важных компонентов об-



ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ...

лигатной микробиоты, значительно меньше, чем аналогичных исследований относительно лактобацилл и бифидобактерий [9].

Представители рода *Propionibacterium* содержат кольцевую хромосому подобно большинству бактерий, размер которой варьирует в пределах от 2,3 Мб до 3,2 Мб в зависимости от вида. Содержание Г+Ц (гуанин + цитозин) в ДНК ПКБ варьирует в пределах 53 – 68 мол % [14].

В настоящее время род *Propionibacterium* классифицируют как отдел *Actinobacteria* с широким диапазоном содержания Г+Ц в ДНК, что делает их более близкими к отделам *Carynobacteria* и *Mycobacteria*, чем к молочнокислым бактериям [24].

Существующее таксономическое положение ПКБ следующее: Отдел *Actinobacteria*; Класс *Actinobacteria*, Подкласс *Actinobacteriae*; Порядок *Actinomycetales*; Подпорядок *Propionibacterineae*; Семейство *Propionibacteriaceae*; Род *Propionibacterium* [28].

Пропионовокислые бактерии – грамположительные, не образующие спор, неподвижные, факультативно-анаэробные или аэротолерантные палочковидные бактерии от 0,5 мкм до 1,5 мкм. Обычно плеоморфные, дифтероидные или булавовидные палочки с одним закругленным, другим – конусообразным или заостренным концом. Клетки в молодых культурах – искривленные, слегка изогнутые палочки, в более старых – кокковидной формы. Расположение клеток: одиночное, парное, в виде коротких цепочек, V- или Y-образное, в виде «китайских иероглифов». Большинство культур лучше растет в анаэробных условиях. Сбраживают углеводы, лактаты, пируваты с образованием пропионовой и уксусной кислот, небольших количеств изовалериановой, муравьиной, янтарной или молочной кислот, CO₂. Лактат и глюкоза более благоприятны в качестве источника энергии, чем лактоза. Основные продукты ферментации лактата показаны в уравнении:



Отношение количества пропионовой кислоты к уксусной обычно равно 2:1, но оно меняется в широких пределах и может достигать 5:1. Наиболее быстрый рост при температуре от 30 °С до 37 °С и pH 7,0. ПКБ ферментируют аланин, серин, аспарагин и глицин с образованием углекислого газа, аммиака, уксусной и пропионовой кислоты. Накопление биомассы максимально при 30 °С, а также достаточно высоко при 20 °С и даже при 7 °С. Большинство штаммов растет в глюкозном бульоне с 20% желчи. Колонии могут быть белыми, серыми, розовыми, красными, желтыми, оранжевыми. При росте в жидкой среде некоторые штаммы образуют тяжелый тянущийся осадок. Непатогенные, обитают в рубце и кишечнике жвачных животных, в молочных продуктах (в основном в твердых сычужных сырах) [3, 18].

Основываясь на локализации ПКБ, их условно делят на две большие группы: молочнокислые или классические и кожные. Классические ПКБ встречаются в сыром молоке, сырах [24], силосе, овощах, ЖКТ человека и в рубце



жвачных животных. Они также были изолированы из кишечника свиней и кур несушек [10]. Кожные ПКБ найдены не только на коже человека, но также были изолированы из кишечника человека, кур, свиней и были представлены как *Propionibacterium acnes* [24]. В пищеварительном тракте здоровых взрослых людей ПКБ присутствуют в количестве не менее 10^5 КОЕ/г фекалий [9].

Тринадцать хорошо изученных видов ПКБ представлены в таблице 1.

С точки зрения безопасности, классические виды ПКБ имеют длительную историю применения в промышленных биотехнологических процессах, главным образом, в качестве стартерных культур при производстве сыров [8, 29], получении пропионовой кислоты и других метаболитов [22, 25].

Таблица 1

Виды молочнокислых и кожных бактерий рода *Propionibacterium* [24]

Table 1

The species of lactic acid and skin bacteria of the genus *Propionibacterium* [24]

Молочнокислые ПКБ	Кожные ПКБ
<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. acidifaciens</i>
<i>P. ceclohexanicum</i>	<i>P. acnes</i>
<i>P. freudenreichii</i>	<i>P. australiense</i>
<i>P. jensenii</i>	<i>P. avudum</i>
<i>P. microaerophilus</i>	<i>P. granulorum</i>
<i>P. thoenii</i>	<i>P. humerusii</i>
	<i>P. propionicus</i>

В настоящее время достаточно данных, свидетельствующих о наличии пробиотических свойств у ПКБ (рис 1). ПКБ устойчивы к действию желчных кислот и выдерживают низкую (рН 2,0) кислотность желудка. Классические ПКБ способны к биосинтезу нутрицевтиков (витаминов В2, В7, В9, В12, К, конъюгированной линоленовой кислоты) [2, 5, 18]. Их оздоровительные эффекты могут быть связаны с влиянием на состав кишечной микробиоты, за исключением патогенов, модуляцией метабиотической активности микробиоты и хозяина, иммуномодуляцией [1, 5, 10].

Основным продуктом жизнедеятельности ПКБ является пропионовая кислота. Биосинтез пропионовой кислоты этими бактериями включает в себя сложный метаболический цикл с несколькими реакциями, в которых субстраты метаболизируются до пирувата по гликолитическому пути, генерируя АТФ и восстановленные коферменты. Затем пируват декарбоксилируется до ацетата и CO_2 или до пропионата. Последнее превращение происходит с помощью цикла Вуда-Веркмана.



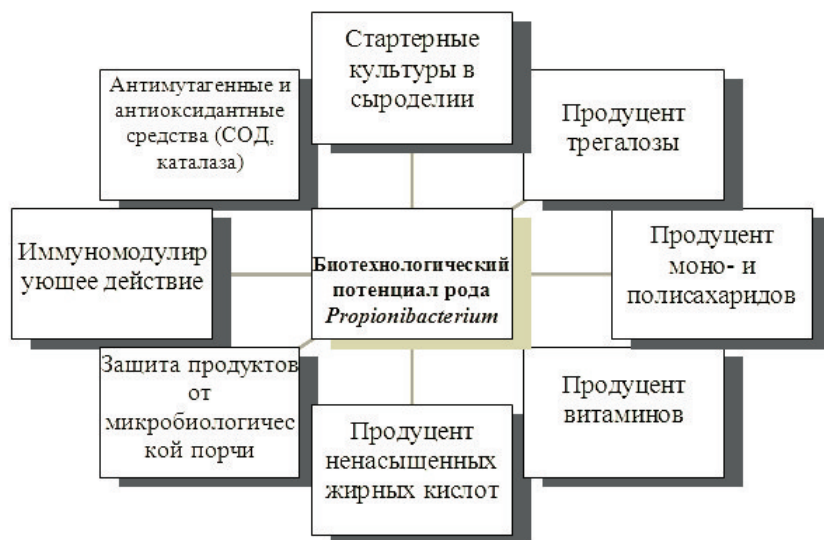


Рис. 1. Биотехнологический потенциал бактерий рода *Propionibacterium*

Fig. 1. Biotechnological potential of bacteria of the genus *Propionibacterium*

Наиболее важная реакция этого цикла транскарбоксилирование, которое переносит карбоксильную группу от метилмалонил-СоА на пируват с образованием оксалоацетата и пропионил-СоА, без потребления АТФ. Фермент, катализирующий эту реакцию, является метилмалонил-СоА карбокситрансферазой [13].

Затем оксалоацетат превращается в сукцинат, посредством реакций гидратации и дегидрирования с образованием малата и fumarата, на которые расходуется две молекулы NADH. Сукцинат затем превращается в пропионат с участием метилмалонил-СоА и образованием промежуточных продуктов (сукцинил-СоА и пропионил-СоА); карбоксильная группа, удаленная из метилмалонил-СоА, переносится на пируват с образованием оксалоацетата, таким образом, завершая один цикл. Метилмалонил-СоА также способен регенерировать сукцинил-СоА в процессе производства пропионата, создавая тем самым второй цикл, и может реагировать с новой молекулой пирувата. Все реакции этого цикла являются обратимыми. Следует подчеркнуть, что цикл Вуда-Веркмана, используемый ПКБ для получения пропионата, связан с окислительным фосфорилированием [26].

Пропионовая кислота, образованная в цикле Вуда-Веркмана, транспортируется в печень и включается в процесс глюконеогенеза и синтеза биогенных аминов, улучшает микроциркуляцию в слизистой кишечника и поддерживает в ней метаболические процессы, блокирует прикрепление к колоницитам условно-патогенной микробиты, и в тоже время стимулирует рост анаэробных бактерий нормальной микробиоты ЖКТ [11, 17, 18].

Витамин В₁₂ является необычным в отношении своего происхождения. Практически все витамины могут быть выделены из разнообразных растений или животных но, ни одно растение или животное не способно производить витамин В₁₂. Источником этого витамина, по современным данным, являются ПКБ [8, 27, 29].

Биосинтез витамина В₁₂ ПКБ происходит параллельно накоплению их биомассы. На образование витамина благоприятное влияние оказывает наличие молочной кислоты, создавая селективность условий [5, 11, 18].

В то же время ПКБ значительно стимулируют рост бифидобактерий [15, 16, 21]. ПКБ являются продуцентами ростовых бифидогенных стимуляторов (РБС), обладающих выраженными пребиотическими эффектами. Исследование [27] показало, что концентрация РБС колеблется в пределах от 0,1 мкг/л до 1 мкг/л. Такие штаммы ПКБ как *P. freudenreichii* ET-3, *P. shermanii* PZ-3, *P. acidipropionici* JCM 6432, *Propionibacterium jensenii* JCM 6433 продуцируют РБС в количестве 4–23 мг/л в анаэробных условиях культивирования. Используя ВЭЖХ хроматографию, установлено, что более 70% от общего содержания РБС составляют 1,4-дигидрокси-2-нафтоиновая кислота (DHNA) [18] и 2-амино-3-карбоксо-1,4-нафтохинон (ACNQ) [19].

Показано, что фильтрат культуральной среды ПКБ обладает выраженным селективным стимулирующим эффектом на рост бифидобактерий. В отличие от пребиотиков углеводной природы, бифидогенный эффект которых связан со стимуляцией роста пробиотических микроорганизмов путем обогащения питательной среды источником углерода [20], ACNQ стимулирует рост бифидобактерий как акцептор электронов при восстановлении NAD⁺ [20, 21]. Восстановленный NAD⁺ считают ответственным за способность ПКБ стимулировать рост бифидобактерий посредством DHNA и ACNQ.

Различные исследования описывают возможность классических ПКБ связывать и удалять из ЖКТ и пищевых продуктов афлатоксин В, токсины *Fusarium sp.*, цианотоксины и некоторые тяжелые металлы, такие как медь и кадмий. Они также ингибируют активность п-глюкуронидазы и нитроредуктазы – ферментов, образуемых кишечной микробиотой и вовлекаемых в образование мутагенов, канцерогенов [2, 8].

Представители классических видов ПКБ образуют ряд белковых бактериоцинов. Виды *P. thoenii* и *P. jensenii* образуют термоустойчивые белки, ингибирующие ряд грамотрицательных и грамположительных бактерий, дрожжей и плесеней [2, 10].

Экспериментальные и клинические испытания препаратов на основе ПКБ показали иммуномодулирующую, противовирусную активность в клинических исследованиях, что связывают с активацией моноцитмакрофаговой системы, индукцией синтеза интерферона и активацией киллерных клеток [2, 13].

ПКБ известны выраженным антимуtagenным действием. Метаболиты ПКБ повышают активность ферментных систем, участвующих в детоксикации поступающих в клетку веществ, оказывая влияние на окислительно-



ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ...

восстановительный потенциал организма, эти процессы приводят к снижению количества мутаций [2, 8].

Важную роль в организме играют антиокислительные ферменты. Синтезируемые ПКБ супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза, образуют антиоксидантную пару, которая инактивирует свободные радикалы кислорода, не давая им возможности запустить процессы цепного окисления, а глутатионпероксидаза обезвреживает липидные перекиси [8].

Таким образом, выше изложенное свидетельствует о том, что пропионовокислые бактерии и их метаболиты служат важным фактором в поддержании баланса микробной экосистемы человека, поэтому актуальной является разработка пробиотических препаратов нового поколения с включением ПКБ.

Л.В. Капрельянц, Л.О. Крупицька

Одеська національна академія харчових технологій,
вул. Канатна, 112, Одеса, 65039, Україна, тел.: +38 (048) 712 41 12,
e-mail: krupitskaja.lora@yandex.ua

ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ПРОПІОНОВОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

Реферат

*У статті наведено відомості наукової літератури щодо фізіологічних та біохімічних властивостей пропионовокислих бактерій, а також їх метаболічної активності, що дозволяє використовувати пропионовокислі бактерії як препарати і продукти харчування пробіотичного призначення при дисбіотичних порушеннях шлунково-кишкового тракту. Розглянуто біотехнологічний потенціал бактерій роду *Propionibacterium*, якому, з погляду конструювання ефективного біокоректора, недостатньо приділено уваги.*

Ключові слова: пробіотики, нормобіота, молочнокислі продукти, пропионовокислі бактерії, пропионова кислота.

L.V. Kaprelyants, L.A. Krupitskaya

Odessa National Academy of Food Technologies
112, Str. Kanatnaya, Odessa, 65039, Ukraine, tel.: +38 (048) 712 41 12,
e-mail: krupitskaja.lora@yandex.ua

PROBIOTIC PROPERTIES AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF PROPIONIC ACID BACTERIA

Summary

This article provides information about the physiological and biochemical properties of propionic acid bacteria, as well as their metabolic capacity, which allows the use



of propionic acid bacteria as medicine and food probiotic appointment at dysbiotic microbiota disorders of the gastrointestinal tract. There were considered the prospects of biotechnological potential of bacteria of the genus Propionibacterium, which should be given attention in terms of designing of effective biocorrectors.

Key words: probiotic, normobiota, fermentation products, propionic acid bacteria, propionic acid.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бережной В.В., Крамарев, С.А., Мартынюк, В.Ю.* Микроэкологические нарушения у детей и современные возможности повышения эффективности их коррекции // *Здоровье женщины.* – 2002. – Т. 4. – №. 12. – С. 79–92.
2. *Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М.* Внеклеточный белок пропионовокислых бактерий ингибирует индуцируемые мутации у штаммов *Salmonella typhimurium* // *Микробиология.* – 2001. – Т. 70. – № 31. – С. 39–44.
3. *Выделение и очистка продуктов биотехнологии.* Методическое пособие / авт.: Д.А. Новиков – Минск.: БГУ, 2014. – 256 с.
4. *Капустян А.И.* Перспективы использования биологически активных бактериальных гидролизатов для нутритивной поддержки населения с расстройствами иммунной системы / А.И. Капустян, Н.К. Черно // *Харчова наука і технологія.* – 2015. – № 2 (31). – С. 18–25.
5. *Плетнева Н.Б., Рожков А.В.* Пропионовокислые бактерии – основное действующее начало симбиотической закваски “Эвита” / *Матер. Научно-техн. конф.* – Симферополь, 2001. – С. 101–103.
6. *Пребиотики: химия, технология, применение.* / Л.В. Капрельянец. – Киев: ЭнтерПринт, 2015. – 252 с.
7. *Свириденко Ю.Я.* Инновационные разработки в области сыроделия / Ю.Я. Свириденко, В.А. Мордвинова // *Сыроделие и маслоделие.* – 2011. – № 3. – С. 17–19.
8. *Хамагаева И. С.* Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий: монография / И. С. Хамагаева, Л. М. Качалина, С. М. Тумурова. – Улан-Удэ : Изд-во ВСГТУ, 2006. – 176 с.
9. *Янковский Д.С.* Состав и функции микробиоценозов различных биотопов человека / *Здоровье женщины,* 2003. – № 4(16). – С. 150–157.
10. *Arganaraz M.E.* Presencia de propionibacterias clásicas de potencial efecto probiótico en intestino de aves de consumo humano. // *Revista Chilena de Nutrición* – 2009. – Vol. 36. – № 1. – P. 677–683.
11. *Cousin F.J. Mater D.D., Foligne B., Jan G.* Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence // *Dairy science & technology.* – 2011. – Vol. 91. – № 1. – P. 1–26.
12. *FAO/WHO.* Joint FAO/WHO Working group Guidelines for the Evolutions of Probiotics in Foods // London. – Ontario. – Canada. – 2002.
13. *Falentin H., Deutsch S., Jan G., Loux V., Thierry A., Parayre S.* The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications. *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5. – P. 11748–11753.



ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ...

14. *Gautier M., Mouchel N., Rouault A.* Determination of genome size of four *Propionibacterium* species by pulsed-field gel electrophoresis. *Lait.* – 1992. – Vol. 72. – P. 421–446.

15. *Gomes A.A., Braga S.P., Cruz A.G., Cadena R.S., Lollo P.C.* Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physico-chemical features and sensory performance compared with commercial cheeses // *Journal of Dairy Science.* – 2011. – Vol. 94. – № 10. – P. 4777–4786.

16. *Hatakka K., Holma R., El-Nezami H., Suomalainen T., Kuisma M., Saxelin M., Korpela R.* The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon // *International journal of food microbiology.* – 2008. – Vol. 128. – № 2. – P. 406–410.

17. *Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Calder P.C.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2014. – Vol. 11. – P. 506–514.

18. *Hugenholtz J., Hunik J., Santos H., Smid E.* Nutraceutical production by *Propionibacteria* / J. Hugenholtz, J. Hunik, H. Santos, E. Smid // *Lait.* 2002. – Vol. 82. – P. 103–112.

19. *Isawa K., HoJo K., Yoda N., Kamiyama T., Makino S., Saito M., Endo N.* Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002. – Vol. 66. – P. 679–681

20. *Kaneko T.* A novel bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*. // *Biosci. Microflora,* – 1999. – Vol. 95. – № 18. – P. 73–80.

21. *Kanmani P., Kanmani P., Satish K.R., Yuvaraj N., Paari K.A., Pattukumar V., Arul V.* Probiotics and its functionally valuable products – A review // *Critical reviews in food science and nutrition.* – 2013. – Vol. 53. – № 6. – P. 641–658.

22. *Michael de Vrese.* Probiotics, prebiotics and synbiotics / Michael de Vrese, J. Schrezenmeir // *Food Biotechnology: Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology.* – 2008. – Vol. 111. – P. 1–66.

23. *Minervini F. et al.* Manufacture of Fior di Latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli // *Journal of dairy science.* – 2012. – Vol. 95. – № 2. – P. 508–520.

24. *Mitsuyama K et al.* Treatment of ulcerative colitis with milk whey culture with *Propionibacterium freudenreichii*. // *J. Intest. Microbiol.* – 2007. – Vol. 21. – № 2. – P. 143–147.

25. *Sullivan A., Nord C.* The place of probiotic in human intestinal infections // *Intern J. of Antimicrobial Agents.* – 2002. – № 20. – P. 313–319

26. *Thierry A.* New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. // *J. Food Microbiol* – 2011. – № 149. – P. 19–27.

27. *Tomoaki Konya et al.* Production of extracellular bifidogenic growth stimulator by anaerobic and aerobic cultivations of several *propionibacterial* strains // *Journal of bioscience and bioengineering.* – 2007. – Vol. 103. – № 5. – P. 464–471.



28. Vos P. et al. (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. – Springer Science & Business Media, 2011. – Т. 3. – 1599 p.
29. Yerlikaya O. Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks // *Food Science and Technology (Campinas)*. – 2014. – Vol. 34. – № 2. – P. 221 – 229.

References

1. Berezhnoy VV, Kramarev SA, Martyinyuk VE, Shunko EE. Microecological disorders in children and advanced features improve the efficiency of their correction. *Women's health*. 2002;(12):79 – 92.
2. Vorobeva LI, Hodzhaev EYu, Ponomareva GM. Extracellular protein propionic acid bacteria inhibits the induced mutations in strains of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*. 2001;(70):39-44.
3. Isolation and purification of biotechnological products. Ed. by D.A. Novikov. BSU, Minsk, 2014. 256 p.
4. Kapustyan AYu Prospects for the use of biologically active bacterial hydrolyzate for nutritional support for people with disorders of the immune system. *Nutritive science i tehnologiya*. 2015;(31):18-25.
5. Pletnev NB, Rozhkov AV. Propionic acid bacteria – the main active principle of symbiotic ferment «Evita». In: *Materials of scientific and technical conference. Simferopol*, 2001:101-103.
6. Kaprelyants LV. *Prebiotics: chemistry, technology and application*. EnterPrint, Kiev, 2015. 252 p.
7. Sviridenko YY Innovative developments in the field of cheese. *Cheesemaking and butter making*. 2011;(3):17- 9.
8. Hamagaeva JS, Kachalina LM, Tumurova SM. *Biotechnology propionic acid bacteria starters: monograph*. Izd ESSTU, Ulan-Ude, 2006. 176 p.
9. Yankovsky DS. The composition and function of various human habitats microbiocenoses. *Women's Health*. 2003;(16):150-157.
10. Arganaraz ME. Presencia de propionibacterias clasicas de potencial efecto probiótico en intestino de aves de consumo humano. *Revista Chilena de Nutrición*. 2009;(36):677-683.
11. Cousin FJ, Mater DD, Foligne B, Jan G. Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence. *Dairy science & technology*. 2011;(91):1-26.
12. FAO/WHO. *Join FAO/WHO Working group Guidelines for the Evolutions of Probiotics in Foods*. London. Ontario.Canada. 2002;(30).
13. Falentin H, Deutsch S, Jan G, Loux V, Thierry A, Parayre S. The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications. *PloS One*. 2010;(5):11748-11753.
14. Gautier M, Mouchel N, Rouault A. Determination of genome size of four *Propionibacterium* species by pulsed-field gel electrophoresis. *Lait*. 1992;(72):421-446.
15. Gomes AA, Braga SP, Cruz AG, Cadena RS, Lollo PC. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical



ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ...

features and sensory performance compared with commercial cheeses. *Journal of Dairy Science*. 2011;(94):4777-4786.

16. Hatakka K, Holma R, El-Nezami H, Suomalainen T, Kuisma M, Saxelin M, Korpela R. The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. *International journal of food microbiology*. 2008;(2):406-410.

17. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Calder PC. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;(11):506-514.

18. Hugenholtz J, Hunik J, Santos H, Smid E. Nutraceutical production by *Propionibacteria*. *Lait*. 2002;(82):103-112.

19. Isawa K, Isawa K, HoJo K, Yoda N, Kamiyama T, Makino S, Saito M, Endo N. Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2002;(66):679-681.

20. Kaneko TA. Novel bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*. *Biosci. Microflora*. 1999(95):73-80.

21. Kanmani P, Satish KR, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V. Probiotics and its functionally valuable products – A review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2013;(53):641-658.

22. Michael de Vrese. Probiotics, prebiotics and synbiotics. *Food Biotechnology: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2008;(111):1-66.

23. Minervini F, Siragusa S, Faccia M, Dal BF, Gobbetti M. Manufacture of Fior di Latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli. *Journal of dairy science*. 2012;(95):508-520.

24. Mitsuyama K, Masuda J, Yamasaki H, Kuwaki K, Kitazaki S, Koga, H, Sata M. Treatment of ulcerative colitis with milk whey culture with *Propionibacterium freudenreichii*. *Journal of Intestinal Microbiology*. 2007;(21):143-147.

25. Sullivan A., Nord C. The place of probiotic in human intestinal infections. *Intern J. of Antimicrobial Agents*. 2002;(20):313-319

26. Thierry A. New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Journal of Intestinal Microbiology*. 2011;(149):19-27.

27. Tomoaki Konya. Production of extracellular bifidogenic growth stimulator by anaerobic and aerobic cultivations of several propionibacterial strains. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2007;(103):464-471.

28. Vos P. et al. (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Science & Business Media, 2011;(3):1599

29. Yerlikaya O. Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2014;(34):221-229.

Стаття надійшла до редакції 12.07.2016 р.



M.V. Boyko, N.V. Patyka, T.I. Patyka

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
13, Heroyiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine, tel.: +38 (097) 4140683,
e-mail: maryaulina@gmail.com

ESTIMATION OF PRODUCTIVITY BACILLUS THURINGIENSIS ON DIFFERENT MEDIA

Aim: Studying the nutrient medium influence on productivity and insecticidal activity of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt). **Materials and methods.** The reference exotoxin strain *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (Bt H1) 800 and selective strain (Bt H1) 87 were used. The common nutrient medium, such as: meat infusion agar, Luria Bertrani (LB), and optimized laboratory–industrial medium: yeast-polysaccharidic composition, technological medium of molasses (4.0%) was used for cultivation. During the development optimal cultivation conditions there were determined the following parameters: producing capacity pure culture through boundary dilutions, the rate of formation entomocidal metabolites by percentage of biotest deaths – larvae of *Leptinotarsa decemlineata* Say. **Results.** It was shown the different technological effect and expression of entomopathogenic activity in different media – from 1.6 to 3.3 billion spores / ml, and from 85.0 to 96.8%, in accordance. Additionally, a high crystal endotoxin productivity was observed in the yeast polysaccharidic medium in comparison with common media. Expressive maximum death of larvae ($L_{1,2}$) is detected on the 10-th day of the experiment on infection load of 1: 1. **Conclusions.** The most conducted interrelation was protein-vitamin complex to cornmeal 2: 1 (3.0 and 1.5% in accordance). This ensures the highest titer of entomocidal components in Bt cultures – 2.8 and 3.3 billion spores/ml.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, nutrient medium, entomopathogenic, properties, cultivation conditions, spores titer.

Bacillus thuringiensis (Bt) – gram positive spore-forming bacterium is the most spreading biopesticide in the biological control market, accounting for 90% of all biopesticides sold all over the world. It is known that this bacterium characteristic feature is its ability to produce crystalline inclusions proteins called endotoxin during sporulation and/ or stationary phase. The Bt preparations are based on endotoxin proteins along with the spores and have a great potential to control a great number of pest insects belonging to the order *Lepidoptera*, *Diptera* and *Coleoptera*.

Optimization of biotechnological production of entomopathogenic preparations based on bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) is connected with the solution of some



problems of microbiological synthesis in combination with selective research of pure growth and conditions of cultivation. [6] A unique feature of bacteria consists in its ability to multiply quickly where there is a number of resources needed for energy, constructive substrate and electron donor. This physiological properties of bacteria and fractional composition of cells are closely related to the growth rate, which depends on external conditions, including the composition of the nutrient medium [1].

Industrial cultivation of *Bt* strains-producers aimed at maximizing output of entomocidal components (exotoxins, endotoxins, related biologically active metabolites) that determines the insecticidal activity of biological products to wide range susceptible insects-"pests" [1, 8]. It is known that the process of crystal and spores formation of entomopathogenic culture *Bt* depends on the sources of nitrogen, carbon and their correspondence, existence in the environment necessary concentration of mineral compounds, sugars [2, 7]. Using high levels of substrate components without corresponding adjustments concentrations on sources of nitrogen can cause changes of pH parameters (from 6.0 to 8.0), which practically leads to slower processes of toxin-, sporogenesis. The main parameters that are monitored during the biotechnological production are also related to the ranges of temperature ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), aeration modes etc. As technological substrates today currently actively use various agricultural and industrial by-products, such as maize glucose, peptone, water after pressing fruits, soybean flour, cereals, grains, beans, oilseeds, peanuts, fish and meat meals, etc [5].

The aim of this work was studying the nutrient medium influence on productivity and insecticidal activity of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*).

Materials and methods

The reference exotoxin strain *B. thuringiensis var. thuringiensis (Bt HI) 800*, which is a producer bio-agent of preparation Bitoksibatsillin and stored in the collections of cultures of non-pathogenic microorganisms agricultural purposes: Institute of Agricultural Microbiology and Agricultural Production, NAAS of Ukraine (Chernigiv), the Federal State Budget Institution All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology (St. Petersburg, Pushkin). Selective protection type strain *B. thuringiensis var. thuringiensis (Bt HI) 87*, isolated from larvae of Colorado potato beetle IV generation in Chernigiv region (collection of useful soil microorganisms) is used in the paper.

Obtaining of pure cultures, preparation serial dilutions of bacterial suspensions, cultivation on liquid and agar nutrient media were conducted by the classical scientific and methodological works in microbiology [1, 9].

The common nutritional medium, such as: meat infusion agar, Luria Bertrani (LB), and optimized laboratory and industrial medium yeast-polysaccharidic composition (3.0% of protein-vitamin complex + 1.5% cornmeal), technological medium of molasses (4.0%) [1], creating the appropriate selective conditions for the development of specifically adapted bacteria *Bt* were used for cultivation.



Cultivation was carried out in Erlenmeyer's flasks on biotechnology shaker with termoplatform (200 rpm, the temperature 30 °C for 48–72 hours). Medium, of volume 50, 100 ml, the amount of inoculum – at least 4.0% by volume of the medium (the titer of colony forming units, CFU, 2.5–3.0 × 10⁹ spores/ml of the culture liquid, which was determined by inoculation on agar and counted in Goryaev chamber). The study of the morphology of bacterial cells was performed by microscopy of fixed preparations stained by carbolic fuchsin, and differentiated color technique V. Smirnof [9]. Microsamples were performed using immersion in light microscope Axio Scope of photographic images (x 100), microscope without immersion on Polivar microscope (x 40).

During the development of optimal process the conditions of cultivation *Bt* strains determined the following parameters: producing capacity of pure culture through boundary dilutions, the rate of formation entomocidal metabolites (spore-crystal complex) the percentage of biotest deaths – larvae of *Leptinotarsa decemlineata* Say. L₁₋₂ when infected culture liquid at dilution of 1:1; 1:10; without dilution. The biological activity of liquid formulations *Bt* strains evaluated in model experiments on intact and contact populations of *Leptinotarsa decemlineata* Say. L₁₋₄ three replications (25 larvae in each). The number of dead beetles account for 5, 7, 10 day experiment according to Abbot formula:

$$A = \frac{M_0 - M_c}{100 - M_c} \times 100,$$

where A – entomocidal activity, (%); M_0 – the percentage of dead larvae in experiment; M_c – the percentage of dead larvae in the control. Death in control will not exceed 15.0%.

Processing of the results was carried out using the descriptive methods (variational) statistics and the analysis of variance on PC using software MS Excel 10.0 and STATISTICA.

Results and discussion

It is known that periodic culture is initiated when seeding in fresh sterile culture medium and runs four main phases: lag-phase (positive growth acceleration), exponential, stationary and bacterial die-away. On the exponential phase the culture medium is constantly changing. At the same time due to the inability to provide equal conditions for the total population relevant part of the cells pass into a state of stress (with the possibility of dying out). Thus, balanced growth is seen as a conditional concept. The main influence on the properties of the cells in the growth process and therefore the properties of exponentially growing population provides a composition of specially selected medium [3, 4].

During the cultivation of *Bt* bacteria there are significant changes for the cultural-morphological, physiological, biochemical, technological characteristics. Thus, a series of experiments, we found that the vegetative stage of growth strains of *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (*Bt HI*) 800 and 87/3 characterized by uniform cells that are connected in pairs or chains. Going to sporogonic is usually charac-



terized by increased growth and development, and the presence of small, isolated cells. Choosing the right nutrient medium ingredients is essential to the success of biotechnological production for quality seed (inoculum) with the efficiency of toxigenic activity of the end products of metabolism. There were investigated nutrient medium balance for the main sources of carbon and nitrogen on development cultures of strains *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (*Bt H1*) 800 and 87. Research results have shown a positive effect of trophic resources selected for the cultivation of *Bt*, at efficiency and entomotoxic components activity, in particular spore-crystal complex (table).

Table

Influence of trophic resources on productivity of entomopathogenic strains *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (model research)

Nutrient media/strain-producer	Productivity, 1x10 ⁹ spores/ml		Death <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say. L ₁₋₂ of spore-crystal complex (interrelation 1: 1) % on 10 day	
	strain № 87	strain № 800	strain № 87	strain № 800
Laboratory – industrial (Yeast polysaccharide resource)	3,0 *	2,4 *	96,8 ± 0,6	95,6 ± 1,2
Industrial (with molasses)	2,7 *	2,6 *	92,0 ± 0,8	94,3 ± 0,5
Common I (meat infusion agar)	1,6 *	1,8 *	85,0 ± 1,1	88,3 ± 1,2
Common II (LB)	2,2 *	1,9 *	87,7 ± 1,8	89,0 ± 1,3

Note: * The results of three experiments presented where titre of viable spores is given maximum limits of variation in productivity *Bt* culture.

Thus, the study of the effect of four growth media (yeast-polysaccharidic, molasses, meat infusion agar, LB) on the productivity of *Bt* strains first serotype has shown different technological effect and expression of entomopathogenic activity – from 1.6 to 3.3 billion spores/ml, and from 85.0 to 96.8%, in accordance. Additionally, in the yeast polysaccharidic medium-synchronic sporogenesis observed which was conducted by a high crystal endotoxin yield in comparison with common media.

Most conducted interrelation was protein-vitamin complex to cornmeal 2: 1 (3.0% and 1.5% in accordance). This ensures the highest titer of entomocidal components in *Bt* cultures – 2.8 and 3.3 billion spores/ml. Expressive maximum death larvae *Leptinotarsa decemlineata* Say younger generation (L₁₋₂) on the 10-th day of the experiment is detected on infection load of 1: 1. Thus, on the 10-th day of the experiment there were about 96.0–97.0% death larvae. When infected of bacterial suspensions *Bt* with lower spores titer (1.5–1.7 billion spores/ml) on meat infusion agar and LB media options entomocidal variables that does not exceed 89.0% are obtained.

Creating a variety of microorganism culture conditions is possible to find out which ones are the most favorable for the identifying the potential production of

biologically active components. Research of accumulation *Bt* culture biomass in different medium (maximum titer of viable spores and crystals to 3.0 billion spores/ml) and liquid preparations functional capacity (biotesting on insecticidal, death *Leptinotarsa decemlineata* Say. L_{1-2} more than 80.0%) provides an opportunity to deepen the scientific theoretical knowledge and practical approaches in the field of biotechnology and analysis of cultures in gradient media, which compositionally is close to natural.

УДК 632.937

М.В. Бойко, М.В. Патика, Т.І. Патика

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв оборони, 13, Київ, 03041, Україна, тел.: +38 (097) 4140683,
e-mail: maryaulina@gmail.com

ОЦІНКА ПРОДУКТИВНОСТІ *BACILLUS THURINGIENSIS* НА РІЗНИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Реферат

Мета роботи: Вивчення впливу живильного середовища на продуктивність та інсектицидну активність ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* (*Bt*).

Матеріали та методи. В роботі використані референтний екзотоксигенний штамп *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (*Bt* H1) 800 та селекційний штамп (*Bt* H1) 87. Для культивування використовували універсальні поживні середовища: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), Лурія Бертрані (LB), а також оптимізовані лабораторно-промислові середовища дріжджо-поліцукридного складу (3,0% білково-вітамінний комплекс +1,5% кукурудзяне борошно), технологічні середовища з м'ясом (4,0%). В процесі розробки оптимальних технологічних параметрів культивування штампів *Bt* визначали такі показники: продуктивність аксенічної культури шляхом граничних розведень, інтенсивність утворення ентомоцидних метаболітів в біотесті за відсотком загибелі личинок *Leptinotarsa decemlineata* Say. **Результати.** Показано різний технологічний ефект та прояв ентомоцидної активності на різних середовищах – від 1,6 до 3,3 млрд спор/мл та від 85,0 до 96,8%, відповідно. Крім цього, на дріжджо-поліцукридному середовищі спостерігали більш високий вихід кристалічного ендотоксину, ніж на звичайних універсальних середовищах. Виразний максимум загибелі личинок (L_{1-2}) зафіксовано на десяту добу досліду при інфекційному навантаженні 1:1. **Висновки.** Найбільш сприятливим виявилось співвідношення білково-вітамінного комплексу до кукурудзяного борошна 2:1 (3,0% і 1,5% відповідно). При цьому досягається найбільший титр ентомоцидних компонентів в культурах *Bt* – 2,8 і 3,3 млрд спор/мл.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, живильні середовища, ентомопатогенні властивості, умови культивування, титр спор.



УДК 632.937

М.В. Бойко, Н.В. Патыка, Т.И. Патыка

Национальный университет биоресурсов и природоиспользования Украины,
ул. Героев обороны, 13, Киев, 03041, Украина, тел.: +38 (097) 4140683
e-mail: maryaulina@gmail.com

ОЦЕНКА ПРОДУКТИВНОСТИ *BACILLUS THURINGIENSIS* НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Реферат

Цель работы: Изучение влияния питательной среды на продуктивность и инсектицидную активность энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* (Bt).

Материалы и методы. В работе использованы референтный экзотоксиногенный штамм *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (Bt H1) 800 и селекционный штамм (Bt H1) 87. Для культивирования использовали универсальные питательные среды: мясо-пептонный агар (МПА), Лурия Бертрани (LB), а также оптимизированные лабораторно-промышленные среды дрожжево-полисахаридного состава (3,0% белково-витаминный комплекс +1,5% кукурузная мука), технологическая среда с мяясой (4,0%). В процессе разработки оптимальных технологических параметров культивирования определяли такие показатели: продуктивность аксеничной культуры путём граничных разведений, интенсивность образования энтомопатогенных метаболитов в биотесте по проценту гибели личинок *Lepidoptarsa decemlineata* Say. **Результаты.** Показан разный технологический эффект и энтомопатогенная активность на различных средах от 1,6 до 3,3 млрд. спор/мл и от 85,0 до 96,8% соответственно. Кроме того, высокая производительность кристаллов эндотоксина наблюдалась в дрожжевой полисахаридной среде, по сравнению с универсальными питательными средами. Выраженный максимум гибели личинок ($L_{1,2}$) обнаружен на 10-й день эксперимента при инфекционной нагрузке 1:1. **Выводы.** Наиболее благоприятным оказалось соотношение белково-витаминного комплекса и кукурузной муки 2:1 (3,0% и 1,5% соответственно). При этом достигается наибольший титр энтомоцидных компонентов в культурах Bt – 2,8 и 3,3 млрд спор/мл.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, питательные среды, энтомопатогенные свойства, условия культивирования, титр спор.

REFERENCES

1. Кандыбин Н.В. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis*. – М.: СПб, Пушкин: Научное издание «Инновационный центр защиты растений», 2009. – 252 с.
2. Avignone-Rossa C., Arcas J., Mignone C. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1992. – V. 8. – P. 301–304.
3. Ennouri K., Ayed R., Hassen H. et al. Improvement of the production of entomopathogenic proteases of *Bacillus thuringiensis* // Tunisian Journal of Plant Protection. –2015. –V. 10. –P. 95–103.
4. Jin-Wen Z., Ya-Fei C., Zheng-Hong X. et al. Production by fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 032 with an improved pH-control glucose feeding strategy // Process Biochemistry. – 2007. – V. 42, № 1. – P. 52–56.



5. Luna-Finkler C.L. Production of Concentrates of Bacterial Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* by flocculation/sedimentation // *Acta Tropica*. – 2008. – V. 107, № 2. – P. 134–138.
6. Pearson D., Ward O.P. Effect of Culture Conditions on Growth and Sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Development of Media for Production of the Protein Crystal Endotoxin // *Biotechnology Letters*. – 1988. – V. 10, № 7. – P. 451–456.
7. Roh J.Y., Choi J.Y., Li M.S. et al. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe and effective tool for insect pest control // *J. Mol. Biol.* – 2007. – V. 4, № 17. – P. 547–559.
8. Silva M., Furigo J.A., Furlan S.A. et al. Production of Bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in semicontinuous processes combined with batch processes for sporulation // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. – 2011. V. 54, № 1. – P. 45–52.
9. Smirnoff V. A. A straining method for differentiating spores, crystals and cells of *Bacillus thuringiensis* // *Insect. Pathol.* – 1962. – P. 384–386.

REFERENCES

1. Kandyibin NV. Microbiological control of insect's quantity and its dominant *Bacillus thuringiensis*. Moscow SPb Pushkin: Innovatsionnyiy tsentr zaschityi rastenyi, 2009. 252 p.
2. Avignone-Rossa C, Arcas J, Mignone C. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1992; (8):301-304.
3. Ennouri K, Ayed R, Hassen H et al. Improvement of the production of entomopathogenic proteases of *Bacillus thuringiensis*. *Tunisian Journal of Plant Protection*. 2015; (10):95-103.
4. Jin-Wen Z, Ya-Fei C, Zheng-Hong X et al. Production by fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 032 with an improved pH-control glucose feeding strategy. *Process Biochemistry*. 2007;42(1):52-56.
5. Luna-Finkler CL. Production of Concentrates of Bacterial Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* by flocculation/sedimentation. *Acta Tropica*. 2008;107(2):134–138.
6. Pearson D, Ward OP. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnology Letters*. 1988;10(7):451-456.
7. Roh JY, Choi JY, Li MS. et al. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe and effective tool for insect pest control. *J Mol. Biol.* 2007;4(17):547-559.
8. Silva M, Furigo JA, Furlan SA et al. Production of Bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in semicontinuous processes combined with batch processes for sporulation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2011;54 (1):45-52.
9. Smirnoff VA. A straining method for differentiating spores, crystals and cells of *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Pathol.* 1962:384–386.

Стаття надійшла до редакції 24.10.2016 р.



УДК 579.262: 579.8

Г.А. Иутинская¹, Л.В. Титова¹, А.Г. Пинаев², Е.Е. Андронов²,
С.В. Вознюк¹

¹ Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, тел.: +38(044) 526 34 79, e-mail: vozsvet@gmail.com

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»,
шоссе Подбельского, 3, Санкт-Петербург, 196608, Россия,
тел.: +7 (812) 470 51 00, e-mail: eeandr@gmail.com

БИОРАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБИОМА РИЗОСФЕРЫ СОИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ФУНГИЦИДОВ И ИНОКУЛЯЦИИ МИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТОМ ЭКОВИТАЛ

Биоразнообразие почвенных микроорганизмов в агроэкосистемах играет ключевую роль в стабилизации и сохранении плодородия почв, повышении продуктивности растений. **Цель.** Изучить разнообразие филумов микробиома темно-серой оподзоленной почвы в ризосфере сои, семена которой обработаны фунгицидами с последующей инокуляцией комплексным микробным препаратом Эковитал. **Методы.** Молекулярно-биологические методы, пиросеквенирование ПЦР-амплификатов участка V4 гена 16S рРНК. **Результаты.** В микробиоме ризосферы сои идентифицированы 20 филумов, 28 классов и 44 порядка бактерий, а также один филум, один класс и два порядка архей. Представленность филума Proteobacteria возросла с 26,2% в контрольном варианте до 35,8–37,6% в вариантах с обработкой семян фунгицидами и инокуляцией, а филумов Bacteroidetes, Firmicutes и Acidobacteria – с 1,5%, 2,1% и 11% в контрольном варианте до 3,5–5,4%, 2,6–4,7% и 12,8–13,3%, соответственно, во всех вариантах обработки. Увеличение индексов биоразнообразия (Шеннона и Менхиника) и снижение индексов доминирования (Симпсона и Бергера-Паркера) указывают на возрастание биоразнообразия в вариантах с применением комплексного инокулянта Эковитал, а также фунгицидов с Эковиталом. **Выводы.** Комплексная инокуляция и ее применение с фунгицидами способствовали увеличению биоразнообразия прокариот в ризосфере сои.

Ключевые слова: микробиом, биоразнообразие, ризосфера сои, пиросеквенирование, инокуляция, фунгициды.

Почва – одна из наиболее заселённых микроорганизмами сред обитания, в одном грамме которой содержится от 2 тыс. до 8,3 млн. бактерий [1]. Известно, что микроорганизмы почвы играют ключевую роль в почвообразовании [2], биогеохимических циклах основных биогенных элементов – углерода [3], азота [4], серы и фосфора, в утилизации отходов, а также в детоксикации пестицидов [5].

© Г.А. Иутинская, Л.В. Титова, А.Г. Пинаев, Е.Е. Андронов, С.В. Вознюк, 2017



Особый интерес представляет микробиом ризосферной почвы, непосредственно прилегающей к корням растений, которые выделяют экссудаты и привлекают микроорганизмы, за счет чего поддерживается высокий уровень биологической активности в почве корневой зоны [6].

Известно, что большинство почвенных бактерий не культивируются в лабораторных условиях [7]. Достижения современной молекулярной биологии способствовали разработке молекулярно-биологических, культурально-независимых (culture-independent) методов изучения биоразнообразия микроорганизмов почвы, основанных на исследованиях тотальной микробной ДНК – метагенома [8]. Наиболее информативным и распространённым является современный метод высокопроизводительного пиросеквенирования, который позволяет определить количественные показатели представленности таксонов, включая доминантные и минорные филумы микробиома почвы, с высокой точностью (97–99%) [9].

Изучение биоразнообразия почв агроценозов является актуальным и привлекает внимание многих исследователей. В современном земледелии интенсивно используются фунгициды, которые могут отрицательно влиять на нецелевые объекты – почвенные бактерии и нарушать экологическое равновесие. Данные о влиянии фунгицидов на разнообразие микроорганизмов почвы известны в литературе [10, 11], в то же время воздействие фунгицидов на почвенный микробиом при применении инокуляции семян мало изучено.

Целью работы было исследовать разнообразие прокариотных филумов микробиома темно-серой оподзоленной почвы ризосферы сои при применении фунгицидов и комплексной инокуляции.

Объекты и методы исследования

Объектом исследований был микробиом ризосферы сои сорта Аннушка, выращиваемой на темно-серой оподзоленной почве. За сутки до посева, семена обрабатывали одним из фунгицидов системного и контактного действия: Максим Стар 025 FS (действующие вещества: флудиоксонил, 18,7 г/л и ципроконазол, 6,25 г/л; Syngenta, Швейцария; доза – 1 л/т семян) и Кинто дуо (действующие вещества: тритиконазол, 20 г/л и прохлораз, 60 г/л; BASF, Швейцария; доза – 1 л/т семян) согласно рекомендациям производителей. В день посева семена инокулировали комплексным микробным препаратом Эковитал [12], в состав которого входили клубеньковые бактерии *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 и УКМ В-6018, а также фосфатмобилизирующие бактерии *Bacillus megaterium* УКМ В-5724. Бактериальная нагрузка составляла 10^7 клеток/семя. В контрольном варианте семена обрабатывали стерильной водопроводной водой. Исследования проводили на базе ННЦ «Институт земледелия НААН» в 2014 году в условиях микрополевых опытов. Площадь учетной делянки – 12,6 м², повторность опыта 4-кратная. Образцы ризосферной почвы отбирали в фазу цветения сои.

Для выявления филумов прокариот в ризосферной почве выделяли тотальную микробную ДНК с применением коммерческого набора Power Soil



DNA Isolation Kit (MO BIO, США). Для конструирования и секвенирования ампликонных библиотек, очищенный препарат ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР с универсальными праймерами F515 GTGCCAGCMGCC-GCGGTAA и R806 GGACTACVSGGGTATCTAAT на переменный участок V4 гена 16S рРНК с добавлением мультиплексных идентификаторов для каждой пробы и служебных последовательностей, которые были необходимы для протокола Roche [13].

Подготовку проб, создание ампликонных библиотек 16S рРНК и высокопроизводительное секвенирование проводили на приборе GS Junior (Roche, USA) в соответствии с методическими рекомендациями производителя [13, 14].

Таксономический анализ нуклеотидных последовательностей ампликонных библиотек осуществляли с помощью компьютерного программного модуля QIIME (версия 1.7.0.) [15]. В процессе анализа выполнялись следующие действия: разделение библиотек по идентификаторам, проверка качества секвенирования и фильтрация нуклеотидных последовательностей, объединение последовательностей в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с использованием 97% порога сходства, выравнивание нуклеотидных последовательностей методом Unclust. Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили с использованием банка данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). К доминантным относили таксоны, доля которых в микробиоме была 2% и выше. Филумы с низкой представленностью метагеномной ДНК (ниже порога чувствительности прибора) обозначали «0». На основе результатов анализа представленности ОТЕ в пробах рассчитывали индексы биоразнообразия: Шеннона (доля определенного вида в сообществе), Менхиника (индекс видового богатства), а также Бергера-Паркера и Симпсона (индексы доминирования).

Молекулярно-биологические исследования были проведены в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Санкт-Петербург.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью методов описательной статистики и компьютерной программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты

Методом пиросеквенирования в микробиоме ризосферной почвы сои было определено 387 ОТЕ, последовательности которых были идентичны 20 филумам бактерий, одному филуму архей, а также часть ОТЕ не была классифицирована (5,8–26,4%).

Анализ таксономической структуры микробиома темно-серой подзолистой почвы ризосферы сои показал, что абсолютными доминантами были бактерии (92,6% от общего количества идентифицированных последовательностей), археи и неидентифицированные последовательности составляли по 3,7%.



В исследуемой почве обнаружены представители 20 бактериальных филумов и один филум архей (табл. 1). Полученные нами результаты близки к данным Сугияма и соавт. [16]. В ризосферной почве сои, богатой органикой, они определили 17 бактериальных филумов, 13 из которых были выявлены и в наших исследованиях: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *OD1* и *TM7*. Кроме отмеченных, нами идентифицированы еще 7 филумов: *Armatimonadetes*, *Chlamydiae*, *Elusimicrobia*, *TM6*, *WPS-2*, *AD3* и *Thermi*. Ли и соавт. [17] исследовали солонцевато-щелочную почву ризосферы сои. В этих опытах было обнаружено 11 филумов прокариот: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Armatimonadetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes* и *TM7*. На основе имеющихся в литературе и собственных результатов можно предположить, что представители филумов *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes* и *TM7* являются характерными для микробиома ризосферы сои, независимо от типа почвы.

Доминирующими филумами во всех вариантах были: *Proteobacteria* – 26,2–7,6%, *Actinobacteria* – 21,4–27,4%, *Acidobacteria* – 11,0–13,3%, *Bacteroidetes* – 1,5–5,4% и *Firmicutes* – 2,1–4,7%. В работе Ли и соавт. [17] доминирующими филумами в ризосфере сои были *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, и *Gemmatimonadetes*, а в исследованиях Сугияма и соавт. [16] – *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi* и *Firmicutes*.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в разных вариантах опыта выявлены как количественные различия в представленности отдельных филумов, так и качественные различия в составе микробиома. Показано возрастание представленности филума *Proteobacteria* – с 26,2% в контрольном варианте до 37,6% в варианте с инокуляцией и до 35,8–36,8% в ризосфере сои, семена которой были обработаны фунгицидами совместно с Эковиталом. Также наблюдали увеличение представленности филума *Firmicutes* – с 2,1% в контрольном варианте до 2,6% в варианте с инокуляцией и до 4,6–4,7% в вариантах с фунгицидами и бактериализацией, филума *Bacteroidetes* – с 1,5% до 3,5% и 3,9–5,4% соответственно.

Из результатов видно, что представленность филума *Acidobacteria* повышалась с 11% в контрольном варианте до 12,8% и 13,3% в вариантах с инокуляцией семян Эковиталом и совместно с Кинто дуо, соответственно, но при этом наблюдали тенденцию к уменьшению представленности в варианте с применением инокуляции и фунгицида Максим Стар. Филум *Actinobacteria* был наиболее широко представлен в контрольном варианте и в варианте с инокуляцией и обработкой фунгицидом Максим Стар – по 27,4%, в то же время в вариантах с Эковиталом и совместно с препаратом Кинто дуо представленность снижалась до 25,8% и 21,4%, соответственно.



Таблица 1

Представленность идентифицированных филумов (%) микробиома темно-серой оподзоленной почвы в ризосфере сои при применении комплексной инокуляции и фунгицидов

Table 1

Representation of identified phylums (%) in microbiome of dark-grey podzolic soil in the soybean rhizosphere under application of complex inoculation and fungicides

Домен	Филум	Контроль	Эковитал	Кинто дуо+Эковитал	Максим Стар+ Эковитал
Archaea	Crenarchaeota	0,8	0,5	0,7	0,6
Bacteria	AD3	0	0	0,05	0,1
	Acidobacteria	11,0	12,8	13,3	10,4
	Actinobacteria	27,4	25,8	21,4	27,4
	Armatimonadetes	0,2	0,1	0,1	0
	Bacteroidetes	1,5	3,5	3,9	5,4
	Chlamydiae	0,2	0,2	0,3	0,2
	Chloroflexi	1	1,1	1,1	1,4
	Cyanobacteria	0,7	0,9	1,2	1
	Elusimicrobia	0,1	0	0,1	0,2
	Firmicutes	2,1	2,6	4,7	4,6
	Gemmatimonadetes	0,9	1,8	1,7	1,7
	Nitrospirae	0,1	0	0,1	0,1
	OD1	0,1	0,1	0	0
	Planctomycetes	0,5	0,8	1,0	0,7
	Proteobacteria	26,2	37,6	36,8	35,8
	TM6	0	0,1	0,1	0,1
	TM7	0,1	0	0	0,1
	Verrucomicrobia	0,4	0,5	1,1	1,3
	WPS-2	0,1	0,5	0,8	0,3
	Thermi	0,1	0,1	0	0
Неклассифицированные		26,4	11,4	11,9	5,8



В вариантах с бактериализацией семян и использованием фунгицидов с последующей инокуляцией наблюдали тенденцию к увеличению представленности филумов *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* и *WPS-2*.

Что касается различий в составе микробиома в разных вариантах опыта, то филум *AD3* обнаружили только в вариантах с обработкой семян фунгицидами и инокулянтном. Филум *Armatimonadetes* не выявлен в ризосфере сои, семена которой были обработаны фунгицидом Максим Стар и Эковиталом, а филумы *Nitrospirae* и *Elusimicrobia* – в варианте с бактериализацией. Филумы *OD1* и *Thermi* были обнаружены только в контрольном и в варианте с Эковиталом, а филум *TM7* – в контрольном и в варианте с инокуляцией и Кинто дуо.

При исследовании микробиома ризосферы сои на уровне классов было идентифицировано 28 бактериальных таксонов, из которых доминирующими были 10 классов: *Acidobacteria*, *DA052*, *Solibacteres*, *Actinobacteria*, *Thermoleophilia*, *Saprospirae*, *Bacilli*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaaproteobacteria* (рис. 1). Наиболее широко представленными были классы *Actinobacteria* (18,2–28,1%), *Alphaproteobacteria* (10,6–18,2%) и *Betaproteobacteria* (11,0–15,5%).

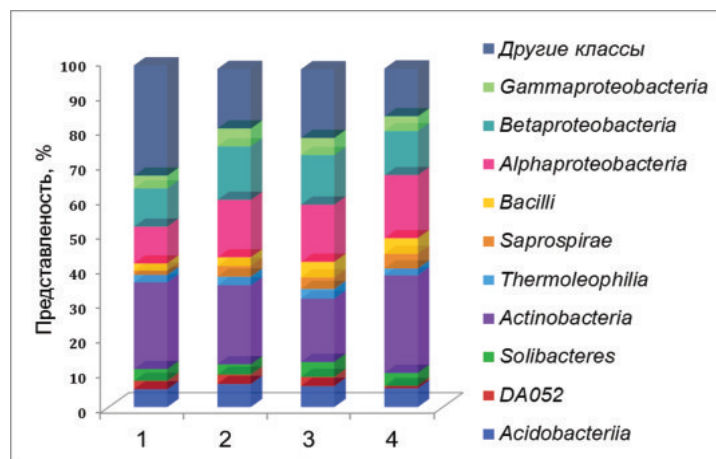


Рис.1. Представленность прокариот на уровне классов, доминирующих в ризосфере сои при применении комплексной инокуляции и фунгицидов.

1 – контроль; 2 – Эковитал; 3 – Кинто дуо+Эковитал; 4 – Максим Стар+ Эковитал
 Fig. 1. Representation of prokaryotes at the class level which are dominant in the soybean rhizosphere under application of complex inoculation and fungicides.

1 – Control; 2 – Ecovital; 3 – Kinto duo+Ecovital; 4 – Maxim Star+Ecovital.

Внутри каждого класса также выделяли доминантные порядки. Среди бактерий класса *Alphaproteobacteria* доминантными были порядки *Sphingomonadales* и *Rhizobiales* (табл. 2). Их доля в микробиоме возрастала во всех опытных вариантах в 1,6–2,2 раза по сравнению с контрольным. При этом оба порядка были более широко представлены в варианте с инокуляцией Эковиталом на фоне фунгицида Максим Стар.



Таблица 2

Представленность доминантных порядков (%) ризосферного микробиома сои при применении комплексной инокуляции и фунгицидов

Table 2

Representation of the dominant orders (%) of the soybean rhizosphere microbiome under application of complex inoculation and fungicides

Класс	Порядок	Контроль	Эковитал	Кинто дуо+ Эковитал	Максим Стар+ Эковитал
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	2,8	5,2	4,9	5,7
	<i>Sphingomonadales</i>	4,5	7,1	8,1	10,0
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	10,1	13,1	12,3	9,9
<i>Gammaaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	2,9	4,1	4,1	3,2
<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	2,1	2,5	4,5	4,5
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriales</i>	5,1	6,7	6,1	5,4
	<i>Ellin6513</i>	2,4	2,7	2,6	0,7
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	25,0	22,8	18,2	28,1
<i>Solibacteres</i>	<i>Solibacterales</i>	3,4	3,0	4,4	3,8
<i>Saprospirae</i>	<i>Saprospirales</i>	1,2	3,1	3,3	4,2
<i>Thermoleophilia</i>	<i>Gaiellales</i>	1,5	1,9	2,2	1,4
Неклассифицированные		26,4	11,4	11,9	5,8

В классе *Betaproteobacteria* преобладал порядок *Burkholderiales* (табл. 2), доля которого в микробиоме увеличивалась в 1,3 и 1,2 раза в вариантах с обработкой семян Эковиталом, а также совместно с фунгицидом Кинто дуо, соответственно. В варианте с совместным использованием Максим Стар и биопрепарата его доля незначительно отличалась от контрольного показателя. Представители порядка *Burkholderiales*, особенно рода *Burkholderia*, защищают большинство культурных растений от болезней, что играет важную роль в борьбе с фитопатогенами [18].

Идентифицированные последовательности бактерий класса *Saprospirae* были отнесены к доминантному порядку *Saprospirales*, относительное содержание которого возрастало в 2,6–3,5 раза во всех опытных вариантах в сравнении с контрольным показателем. Среди класса *Thermoleophilia* определены представители доминантного порядка *Gaiellales*, доля которого была выше в 1,3 и 1,6 раза в ризосфере сои, семена которой инокулировали Эковиталом, и в варианте с Кинто дуо и биопрепаратом (относительно контрольного варианта) соответственно.



Для доминантных классов *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* и *Solibacterales* установлены незначительные изменения их представленности в микробных сообществах, населяющих ризосферную почву сои. Доля идентифицированных бактерий, относящихся к доминантному порядку *Xanthomonadales*, увеличивалась с 2,9% в контрольном варианте до 3,2–4,1% во всех опытных вариантах. Представленность доминантного порядка *Bacillales* возрастала с 2,1% в контрольном варианте до 2,5–4,5% в опытных. Доля представителей порядка *Acidobacteriales* увеличивалась с 5,1% в контрольном варианте до 5,4–6,7% в вариантах с обработкой семян Эковиталом и фунгицидами с последующей инокуляцией, а порядка *Ellin 6513* – с 2,4% до 2,6% и 2,7% (кроме варианта с Максим Стар и биопрепаратом, где этот показатель снижался до 0,7%). Самое высокое относительное содержание обоих порядков было в ризосфере сои, семена которой инокулировали Эковиталом, – 6,7% и 2,7% соответственно. Доля бактерий, отнесенных к порядку *Actinomycetales*, в микробиоме ризосферы сои увеличивалась с 25,0% в варианте без обработки до 28,1% в варианте с Максим Стар и Эковиталом. В остальных опытных вариантах этот показатель снижался до 18,2 и 22,8%. Представленность доминантного порядка *Solibacterales* увеличивалась с 3,4% в контрольном варианте до 3,8 и 4,4% в вариантах с использованием фунгицидов Максим Стар и Кинто дуо с последующей бактериализацией, соответственно.

Следует подчеркнуть, что в результате исследований идентифицированы также представители домена архей, которые были отнесены к филуму *Crenarchaeota*, классу *Thaumarchaeota* и 2 порядкам *Cenarchaeales* и *Nitrososphaerales*, доля которых была самой высокой в контрольном варианте.

На повышение биоразнообразия в вариантах с применением Эковитала и фунгицидов указывают основные индексы биоразнообразия (табл. 3). Увеличение индекса Шеннона с 3,4 в контрольном варианте до 3,82–3,97 в вариантах с применением комплексного микробного препарата Эковитал и фунгицидов совместно с инокуляцией свидетельствует о возрастании биоразнообразия. Значение индекса видового богатства Менхиника также увеличивалось с 136 в контрольном варианте до 140–155 в варианте с комплексной обработкой семян. Это может свидетельствовать о благоприятных условиях для формирования широкого полиморфизма прокариот темно-серой оподзоленной почвы ризосферы сои. Снижение индексов доминирования Симпсона и Бергера-Паркера в вариантах с применением Эковитала и фунгицидов также указывает на увеличение биоразнообразия ризосферных бактерий в этих вариантах.

Таким образом, при исследовании микробиома ризосферы сои методом пиросеквенирования идентифицированы 20 филумов, 28 классов и 44 порядка бактерий, а также один филум, один класс и два порядка архей. Доминирующими филумами во всех вариантах были *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*. Комплексная инокуляция и комбинированная обработка семян сои биопрепаратом Эковитал с фунгицидами способствовала возрастанию представленности доминантных филумов прокариот по сравнению с контрольным вариантом.



Экологические показатели биоразнообразия прокариот почвенного ризосферного микробиома

Table 3

Ecological indicators of prokaryotes biodiversity of soil rhizosphere microbiome

Индексы	Контроль	Эковитал	Кинто дуо+ Эковитал	Максим Стар+ Эковитал
Индекс видового богатства (индекс Менхиника)	136	140	155	153
Индекс Шеннона	3,4	3,82	3,93	3,97
Индекс доминирования Симпсона	0,1	0,05	0,045	0,044
Индекс доминирования Бергера-Паркера	0,26	0,12	0,16	0,15

Увеличение индексов Шеннона и Менхиника и снижение индексов доминантности Симпсона и Бергера-Паркера указывают на возрастание биоразнообразия прокариот в ризосфере сои, инокулированной комплексным биопрепаратом, а также при комбинированной обработке семян фунгицидами с последующей бактеризацией Эковиталом.

Г.О. Іутинська¹, Л.В. Титова¹, О.Г. Пінаєв², Є.Є. Андронов²,
С.В. Вознюк¹

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03143, тел.: +38(044) 526 34 79, e-mail: vozsvet@gmail.com

²Федеральна державна бюджетна наукова установа «Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології», шосе Підбільського, 3, м.Санкт-Петербург, 196608, Росія, тел.: +7 (812) 470 51 00, e-mail: eeandr@gmail.com

БІОРІЗНОМАНІТНІСТЬ МІКРОБІОМУ РИЗОСФЕРИ СОЇ ЗА ЗАСТОСУВАННЯ ФУНГІЦИДІВ ТА ІНОКУЛЯЦІЇ МІКРОБНИМ ПРЕПАРАТОМ ЕКОВІТАЛ

Реферат

Біорізноманітність ґрунтових мікроорганізмів в агроекосистемах відіграє ключову роль у стабілізації та збереженні родючості ґрунтів, підвищенні продуктивності рослин. **Мета.** Вивчити різноманітність філумів мікробіому темно-сірого підзолістого ґрунту у ризосфері сої, насіння якої оброблене фунгіцидами з подальшою інокуляцією комплексним мікробним препаратом Ековітал. **Методи.** Молекулярно-біологічні, піросеквенування ПЦР-ампліфікатів ділянки V4 гена 16S рРНК. **Результати.** У мікробіомі ризосфери сої ідентифіковано 20 філумів, 28 класів і 44 порядки бактерій, а також один філум, один клас і два порядки архей. Представленість філуму *Proteobacteria*



зростала з 26,2% у контрольному варіанті до 35,8–37,6% у варіантах з обробкою фунгіцидами та інокуляцією, а філумів *Bacteroidetes*, *Firmicutes* і *Acidobacteria* – з 1,5%, 2,1% та 11% у контрольному варіанті до 3,5–5,4%, 2,6–4,7% і 12,8–13,3%, відповідно, в усіх варіантах обробки. Збільшення індексів біорізноманітності (Шеннона і Менхініка) та зниження індексів переважання (Сімпсона і Бергера-Паркера) вказують на зростання біорізноманітності у варіантах із застосуванням комплексного інокулянта Ековітал, а також фунгіцидів з Ековіталом. **Висновки.** Комплексна інокуляція і її застосування з фунгіцидами сприяли збільшенню біорізноманітності прокаріот у ризосфері сої.

Ключові слова: мікробіом, біорізноманітність, ризосфера сої, піросеквенування, інокуляція, фунгіциди.

G.O. Iutynska¹, L.V. Tytova¹, O.G. Pinaev², E.E. Andronow²,
S.V. Vozniuk¹

¹D.K.Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine
tel.: +38(044) 526 34 79, e-mail: vozsvet@gmail.com

²All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific
Organizations, 3, Podbelskogo str,
St. Petersburg, 196608, Russia,
tel.: +7 (812) 470-51-00, e-mail: eeandr@gmail.com

MICROBIOME BIODIVERSITY OF SOYBEAN RHIZOSPHERE UNDER APPLICATION OF FUNGICIDES AND INOCULATION BY MICROBIAL BIOFORMULATION ECOVITAL

Summary

Biodiversity of soil microorganisms in the agroecosystems plays the major role for stabilization and conservation of soil fertility, increasing plants productivity. Aim. To study the diversity of microbiome phylums of the dark-grey podzolic soil in the soybean rhizosphere, the seeds treated by fungicides with following inoculation with the complex microbial bioformulation Ecovital. **Methods.** Molecular-biological methods, pyrosequencing of PCR-amplicons of 16S rRNA gene V-4 region. **Results.** In soybean rhizosphere microbiome, there were identified 20 phylums, 28 classes and 44 orders of Bacteria, and one phylum, one class and two orders of Archaea. The representation of Proteobacteria phylum has increased from 26.2% in the control sample to 35.8–37.6% in the samples with the application of fungicides and inoculation, Bacteroidetes, Firmicutes and Acidobacteria phylums has increased from 1.5%, 2.1% and 11% in the control sample to 3.5–5.4%, 2.6–4.7% and 12.8–13.3% in all researched samples, respectively. The increase of biodiversity indices (Shannon's and Menhinik's indices) and the decrease of dominance indices (Simpson's and Berger-Parker's indices) indicate the increase of biodiversity for the samples with application of complex inoculant Ecovital and fungicides with Ecovital. **Conclusions.** Complex inoculation and its combined use with fungicides have promoted the increase of prokaryotes biodiversity in soybean rhizosphere.

Key words. microbiome, biodiversity, pyrosequencing, inoculation, fungicides.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schloss P.D., Handelsman J.* Toward a census of bacteria in soil // PLOS Computational Biology. – 2006. – № 2. – P. 786–793.
2. *Usman S., Muhammad Y., Chiroman A.M.* Roles of soil biota and biodiversity in soil environment – a concise communication // Eurasian J Soil Sci. – 2016. – 5, №4. – P. 255–265.
3. *Gougoulias C., Clark J.M., Shaw L.J.* The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems // J Sci Food Agric. – 2014. – №94. – P. 2362–2371.
4. *Boyle S.A., Yarwood R.R., Bottomley P.J., Myrold D.D.* Bacterial and fungal contributions to soil nitrogen cycling under Douglas fir and red alder at two sites in Oregon // Soil Biology and Biochemistry. – 2008. – № 40. – P. 443–451.
5. *Aislabie J., Deslippe J.R.* Soil microbes and their contribution to soil services // Dymond J.R. Ecosystem services in New Zealand – conditions and trends. Manaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand. – 2013. – P. 143–162.
6. *Hartmann A., Rothballer M., Schmid M., Hiltner L.* A pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research // Plant and Soil. – 2007. – 312, №1–2. – P. 7–14.
7. *Handelsman J.* Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2004. – 68, № 4. – P. 669–685.
8. *Rincon-Florez V.A., Carvalhais L.C., Schenk P.M.* Culture-Independent Molecular Tools for Soil and Rhizosphere Microbiology // Diversity. – 2013. – № 5. – P. 581–612.
9. *Fakruddin M.D., Chowdhury A., Nur Hossain M.D., Bin Mannan K.S., Mazumdar R.M.* Pyrosequencing – principles and applications // International Journal of Life Science and Pharma Research. – 2012. – 2, № 2. – P. 65–76.
10. *Hussain S., Siddique T., Saleem M., Arshad M., Khalid A.* Impact of Pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions // Advances in Agronomy. – 2009. – 102, № 1. – P. 159–200.
11. *Loa C-C.* Effect of pesticides on soil microbial community // Journal of Environmental Science and Health (Part B). – 2010. – №45. – P. 348–359.
12. *Patent UA 101388 C2 (Ukraine), IPS (2013.01) C 05 F 11/100, C 12 P 39/00.* Complex microbial bioformulation Ecovital for leguminous crops seeds inoculation. Tytova LV, Leonova NO, Brovko IS, Iutyńska GA. Pub. 25.03.2013, Bull. N 6.
13. *Sequencing Method Manual for GS Junior Titanium Series.* Method Manual. 454 Life Sciences Corp. A Roche Company Branford. – 2012. – 26 p.
14. *emPCR Amplification Method Manual. Lib-L for GS Junior Titanium Series.* Method Manual. 454 Life Sciences Corp. A Roche Company Branford. – 2012. – 12 p.
15. *Kuczynski J., Stombaugh J., Walters W.A., Gonzalez A., Caporaso J.G., Knight R.* Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from Microbial Communities. Curr Protoc. In Bioinformatics. – 2012. – 28 p.



16. Sugiyama A., Ueda Y., Zushi T., Takase H., Yazaki K. Changes in the bacterial community of soybean rhizospheres during growth in the field // PLOS ONE. – 2014. – 9, №6. – P. 1–9. (www.plosone.org).

17. Li X., Sun M., Zhang H., Xu N., Sun G. Use of mulberry-soybean intercropping in salt-alkali soil impacts the diversity of the soil bacterial community // Microbial Biotechnology. – 2016. – 9, № 3. – P. 293–304.

18. Van Der Heijden M.G., Bardgett R.D., Van Straalen N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems // Ecol Lett. – 2008. – № 11. – P. 296–310.

References

19. Schloss PD, Handelsman J. Toward a census of bacteria in soil. PLOS Computational Biology. 2006; (2): 786-793.

20. Usman S, Muhammad Y, Chiroman AM. Roles of soil biota and biodiversity in soil environment – a concise communication. Eurasian J Soil Sci. 2016; 5 (4): 255- 265.

21. Gougoulas C, Clark JM, Shaw LJ. The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. J Sci Food Agric. 2014; (94): 2362-2371.

22. Boyle SA, Yarwood RR, Bottomley PJ, Myrold DD. Bacterial and fungal contributions to soil nitrogen cycling under Douglas fir and red alder at two sites in Oregon. Soil Biology and Biochemistry. 2008; (40): 443-451.

23. Aislabie J, Deslippe JR. Soil microbes and their contribution to soil services. Dymond JR ed. Ecosystem services in New Zealand – conditions and trends. Manaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand. 2013: 143-162.

24. Hartmann A, Rothballer M, Schmid M, Hiltner L. A pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. Plant and Soil. 2007; 312(1-2): 7-14.

25. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2004; 68(4): 669-685.

26. Rincon-Florez VA, Carvalhais LC, Schenk PM. Culture-Independent Molecular Tools for Soil and Rhizosphere Microbiology. Diversity. 2013; (5): 581-612.

27. Fakruddin MD, Chowdhury A, Nur Hossain MD, Bin Mannan KS, Mazumdar RM. Pyrosequencing – principles and applications. International Journal of Life Science and Pharma Research. 2012; 2 (2): 65-76.

28. Hussain S, Siddique T, Saleem M, Arshad M, Khalid A. Impact of Pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. Advances in Agronomy. 2009; 102(1):159-200.

29. Loa C-C. Effect of pesticides on soil microbial community. Journal of Environmental Science and Health (Part B). 2010; (45): 348-359.



30. Patent UA 101388 C2 (Ukraine), IPS (2013.01) C 05 F 11/100, C 12 P 39/00. Complex microbial bioformulation Ecovital for leguminous crops seeds inoculation. Tytova LV, Leonova NO, Brovko IS, Iutynska GA. Pub. 25.03.2013, Bull. N 6.
31. Sequencing Method Manual for GS Junior Titanium Series. Method Manual. 454 Life Sciences Corp. A Roche Company Branford. 2012. 26 p.
32. emPCR Amplification Method Manual. Lib-L for GS Junior Titanium Series. Method Manual. 454 Life Sciences Corp. A Roche Company Branford. 2012. 12 p.
33. Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, Gonzalez A, Caporaso JG, Knight R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from Microbial Communities. Curr Protoc. In Bioinformatics. 2012. 28 p.
34. Sugiyama A, Ueda Y, Zushi T, Takase H, Yazaki K. Changes in the bacterial community of soybean rhizospheres during growth in the field. PLOS ONE. 2014; 9(6): 1-9. (www.plosone.org).
35. Li X, Sun M, Zhang H, Xu N, Sun G. Use of mulberry–soybean intercropping in salt-alkali soil impacts the diversity of the soil bacterial community. Microbial Biotechnology. 2016; 9(3): 293-304.
36. Van Der Heijden MG, Bardgett RD, Van Straalen NM. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. Ecol Lett. 2008; (11): 296-310.

Стаття надійшла до редакції 23.01.2017 р.



А.Г. Мерліч, Н.В. Ліманська, І.Д. Жунько, Д.О. Бабенко

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

ВПЛИВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ТА *BACILLUS ATROPHAEUS* НА ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ ТА РІСТ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ

Мета. Вивчення впливу бактерій штамів *Lactobacillus plantarum* ОНУ12, ОНУ311 та *Bacillus atrophaeus* ОНУ528 на проростання насіння пшениці та ростові характеристики проростків. **Методи.** Бактеризація поверхнево простерилізованого насіння розведеними культурами з подальшим прощуванням в вологих камерах та вимірюванням ростових характеристик проростків. **Результати.** Обробка *L. plantarum* ОНУ311 збільшувала довжини коренів проростків на 31% порівняно з контролем та стимулювальний вплив на довжину надземної частини складав 48%. Суміш бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311 збільшувала довжину коренів та надземних частин проростків на 41,1 та 52,4% відповідно, та підвищувала схожість насіння на 25%. Обробка пшениці бактеріями *B. atrophaeus* ОНУ528 сприяла збільшенню середньої довжини коренів на 39,7% та надземних частин проростків на 45% порівняно з контролем. **Висновки.** Бактерії *L. plantarum*, *B. atrophaeus* та їх суміш проявили стимулювальний вплив як на корені так і на надземні частини проростків пшениці. Вплив лактобактерій залежав як від штамів, використаних в експерименті, так і від концентрацій бактеріальних клітин.

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus atrophaeus*, стимулювальна активність, пшениця.

У практиці аграрного виробництва накопичено значний матеріал, який певнено підтверджує ефективність використання різних мікроорганізмів, зокрема, ризосферних азотфіксувальних та фосфатмобілізувальних бактерій, для стимуляції росту та розвитку рослин. Менш досліджена в цьому напрямку група різноманітних молочнокислих бактерій, одним із середовищ проживання яких є ризосфера рослин [6].

Відомо, що стимулювання росту рослин може бути досягнуто опосередковано через підвищення поглинання мінералів та поживних речовин, або прямо за допомогою регулювання рослинних гормонів, таких як індолілоцтова кислота (ІОК), цитокініни та етилен [13]. Встановлено стимулювальну активність молочнокислих бактерій щодо ростових характеристик огірків [10], перцю [13], томатів [8], та бацил щодо низки сільськогосподарських культур [2, 3, 4].

Метою роботи було вивчення впливу *Lactobacillus plantarum* та *Bacillus atrophaeus* на проростання насіння та ростові характеристики сіяньців пшениці.

© А.Г. Мерліч, Н.В. Ліманська, І.Д. Жунько, Д.О. Бабенко, 2017



Матеріали і методи

В експериментах використовували штами *Lactobacillus plantarum* ОНУ12 та ОНУ311, ізолювані з винограду та штам *Bacillus atrophaeus* ОНУ528, ізолюваний з ґрунту. Лактобактерії культивували в рідкому середовищі MRS [8], а бацили в середовищі NB при 28 °С [1]. В експериментах були використані такі варіанти обробки насіння: культура бактерій *L. plantarum* ОНУ12 в концентрації $1,78 \times 10^7$ КУО/мл, *L. plantarum* ОНУ311 ($1,47 \times 10^7$ КУО/мл), суміш культур бактерій *L. plantarum* ОНУ12 + *L. plantarum* ОНУ311 ($1,62 \times 10^7$ КУО/мл), *L. plantarum* ОНУ311 ($2,94 \times 10^7$ КУО/мл). Як контролю було використано MRS 1%, MRS 2% та воду з водогону.

Насіння пшениці сортосуміші поверхнево стерилізували шляхом занурення у 25% розчин перекису водню на одну хвилину. Від залишків перекису водню насіння промивали три рази у стерильній воді із водогону. Насіння замочували у приготовлених суспензіях молочнокислих бактерій впродовж однієї години, після чого стерильним пінцетом переносили у стерильні чашки Петрі з дисками фільтрувального паперу на дні та на внутрішній поверхні кришки. Дно камер змочували 15 мл стерильної води із водогону. Насіння пророщували у теплиці при 25 °С, змочуючи вологі камери по мірі підсихання. Після п'яти днів пророщування вимірювали довжину коренів та надземних частин рослин.

Для дослідження впливу надосадових рідин (НОР) культур та відмитих клітин лактобацил на ріст рослин здійснювали обробку поверхнево-простерилізованого насіння пшениці. В експериментах використовували НОР та бактерії, які були відділені шляхом центрифугування (10 хв, 10000 g) та промивання в дистильованій воді. В роботі використовували варіанти обробки, які були ефективними у попередніх експериментах. Обробку та пророщування насіння здійснювали, як описано вище.

Для вивчення впливу бактерій штаму *B. atrophaeus* ОНУ528 та його комбінації з *L. plantarum* ОНУ12 було використано такі варіанти обробки: культура бактерій *B. atrophaeus* ОНУ528 в концентрації $6,14 \times 10^5$ КУО/мл, культура *L. plantarum* ОНУ12 ($1,75 \times 10^7$ КУО/мл), та їх суміш у співвідношенні 1:1. Як контроль використано воду з водогону.

Після п'яти днів пророщування вимірювали довжину коренів та надземних частин проростків. Дослідження проводили у трьох незалежних експериментах та статистичне опрацювання (середнє значення, стандартне відхилення, довірчий інтервал) здійснювали за допомогою програми Microsoft Office Excel.

Результати та їх обговорення

Бактерії штамів *L. plantarum*, використані у дослідженнях, показали різну активність щодо проростання насіння пшениці (рис. 1, 2). Так, *L. plantarum* ОНУ12 в концентрації $1,78 \times 10^7$ КУО/мл не проявили достовірного впливу на ріст рослин, тоді як *L. plantarum* ОНУ311, при подібній концентрації ($1,47 \times 10^7$ КУО/мл) достовірно ($p \leq 0,05$) сприяли збільшенню довжини як коренів, так і надземних частин рослин (рис. 1, 2).



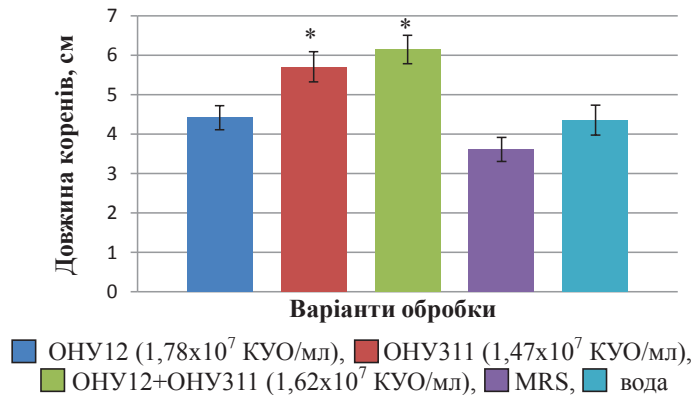


Рис. 1. Вплив бактерій штамів *L. plantarum* на ріст коренів пшениці

Примітка: * – різниця у порівнянні з контролем (водою) є достовірною ($p \leq 0,05$)

Fig. 1. Effect of bacteria of *L. plantarum* strains on the growth of wheat roots

Note: * – significant different from the control (water) ($p \leq 0,05$)

Вплив бактерій штаму *L. plantarum* ONU311 у концентрації $1,47 \times 10^7$ КУО/мл відрізнявся по відношенню до коренів та надземної частини проростків. Так, після обробки цим штамом середня довжина коренів проростків складала $5,7 \pm 0,4$ см, тоді як довжина надземних частин – $7,3 \pm 0,3$ см. В той же час, довжина коренів у випадку обробки водою була $4,4 \pm 0,4$ см та надземних частин – $5 \pm 0,4$ см. Отже, після обробки *L. plantarum* ONU311 відмічено збільшення довжини коренів проростків на 31% порівняно з контролем. В той же час, стимулювальний вплив на довжину надземної частини складав 48%.

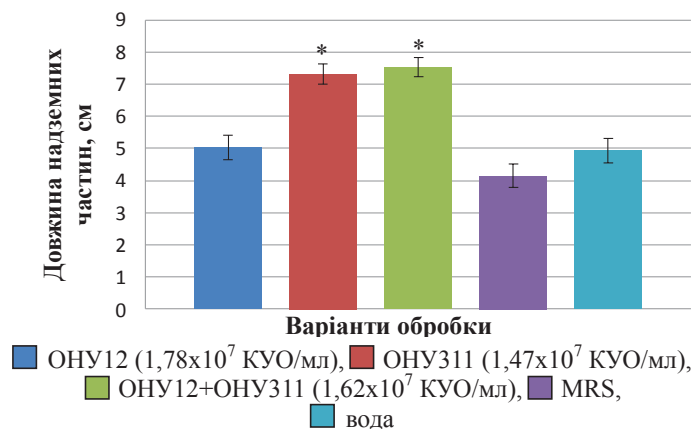


Рис. 2. Вплив бактерій штамів *L. plantarum* на ріст надземних частин пшениці

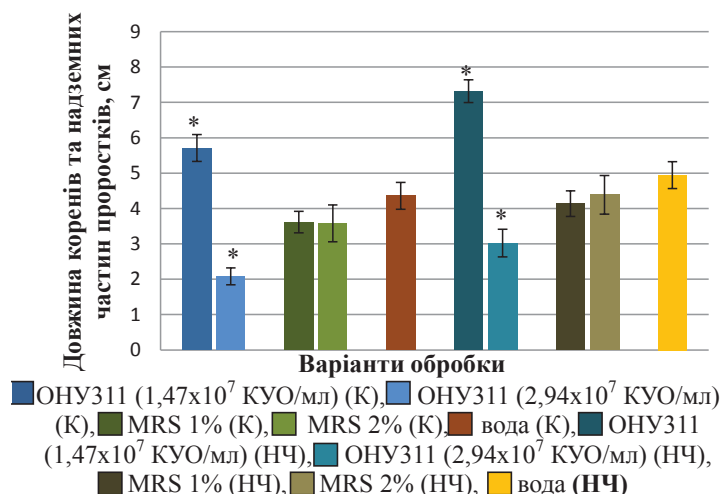
Примітка: * – різниця у порівнянні з контролем (водою) є достовірною ($p \leq 0,05$)

Fig. 2. Effect of bacteria of *L. plantarum* strains on wheat height

Note: * – significant different from the control (water) ($p \leq 0,05$)



Крім того, вплив бактерій *L. plantarum* ОНУ311 значною мірою залежав від концентрації клітин, якими обробляли насіння перед пророщуванням (рис. 3).



(К – корені, НЧ – надземні частини)

Рис.3. Вплив бактерій штаму *L. plantarum* ОНУ311 в концентрації 1,47x10⁷ and 2,94x10⁷ КУО/мл на ріст коренів та надземних частин пшениці

Примітка: * – різниця у порівнянні з контролем (водою) є достовірною (p≤0,05)

Fig.3. Effect of bacteria of *L. plantarum* ONU311 strain in concentration 1,47x10⁷ and 2,94x10⁷ CFU/ml on the growth of wheat roots and wheat height (К – roots, НЧ – height)

Note: * – significant different from the control (water) (p≤0,05)

При збільшенні концентрації бактерій до 2,94x10⁷ КУО/мл стимульовальна активність зникала та спостерігалася навіть певне пригнічення росту рослин порівняно з контролем (довжина коренів та надземних частин складала 2±0,2 та 3±0,4 см відповідно).

Стимульовальну активність в нашому дослідженні продемонструвала також комбінація бактерій двох штамів *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311 при концентрації 1,62x10⁷ КУО/мл (рис. 1–2). Стимулювання росту рослин проявилася збільшенням довжини як надземних частин (7,5±0,3 см) так і коренів рослин (6,2±0,4 см). Таким чином, обробка бактеріями у цій комбінації збільшувала довжину коренів на 41,1% порівняно з контролем, а стимульовальний вплив на довжину надземних частин складав 52,4%.

Комбінація бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311 збільшувала також схожість насіння пшениці на 25% порівняно з контролем (рис. 4).

Обробка пшениці за допомогою НОР та відмитими бактеріальними клітинами штамів *L. plantarum* ОНУ311 та ОНУ12 та їх сумішню показала, що найбільша стимульовальна активність спостерігалася після обробки насіння НОР штаму *L. plantarum* ОНУ311 (рис. 5).

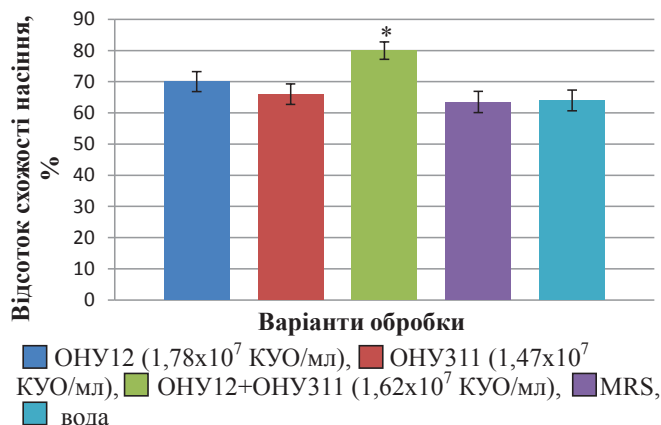


Рис.4. Вплив бактерій штамів *L. plantarum* на схожість насіння пшениці

Примітка: * – різниця у порівнянні з контролем (водою) є достовірною ($p \leq 0,05$)

Fig.4. Effect of bacteria of *L. plantarum* strains on germination of wheat seeds

Note: * – significant different from the control (water) ($p \leq 0,05$)

Після обробки НОР та відмитими бактеріальними клітинами штаму *L. plantarum* ОНУ311 довжина коренів проростків складала $3,9 \pm 0,3$ та $3,8 \pm 0,3$ см відповідно, тоді як у контрольному варіанті – $2,8 \pm 0,2$ см. Отже, обробка НОР штаму *L. plantarum* ОНУ311 збільшувала довжину коренів на 40,8% порівняно з контролем та обробка відмитими клітинами цього ж штаму стимулювала ріст коренів на 35,8%. В той же час, обробка НОР або відмитими клітинами даного штаму не призвела до статистично значимого стимулювання росту надземних частин проростків пшениці.

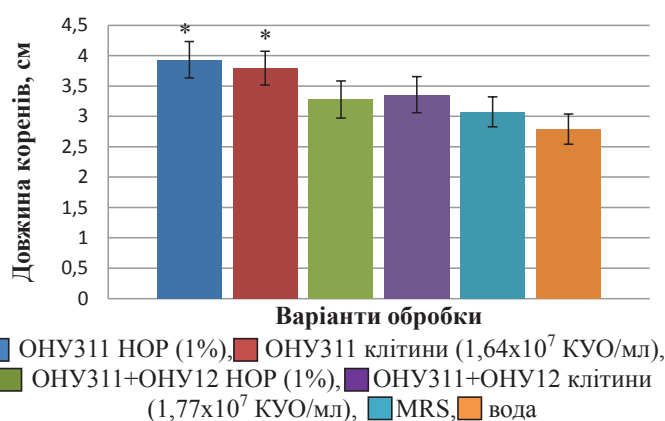


Рис.5. Вплив НОР та відмитих бактерій штамів *L. plantarum* на довжину коренів пшениці

Примітка: * – різниця у порівнянні з контролем (водою) є достовірною ($p \leq 0,05$)

Fig.5. Effect of supernatants and washed bacteria of *L. plantarum* strains on the length of wheat roots

Note: * – significant different from the control (water) ($p \leq 0,05$)



Обробка пшениці *B. atrophaeus* ONU528 в концентрації $6,14 \times 10^5$ КУО/мл сприяла збільшенню середньої довжини як коренів, так і надземних частин проростків порівняно з контролем (рис. 6–8).

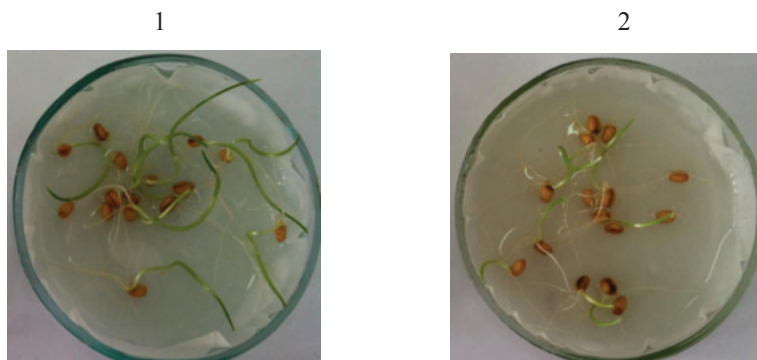


Рис.6. Проростки пшениці після обробки бактеріями штаму *B. atrophaeus* ONU528 (1) порівняно з контролем (2)

Fig.6. Wheat seedlings after treatment with bacteria of the strain *B. atrophaeus* ONU528 (1) compared with the control (2)

Так, середня довжина коренів після обробки складала $5,3 \pm 0,6$ см та надземних частин – $6,3 \pm 0,7$ см, тоді як у контрольному варіанті ці показники склали $3,8 \pm 0,9$ і $4,3 \pm 0,9$ см, відповідно. Таким чином, спостерігалось збільшення середньої довжини коренів проростків на 39,7% порівняно з контролем (рис. 7), тоді як збільшення середньої довжини надземних частин складало 45% (рис. 8).

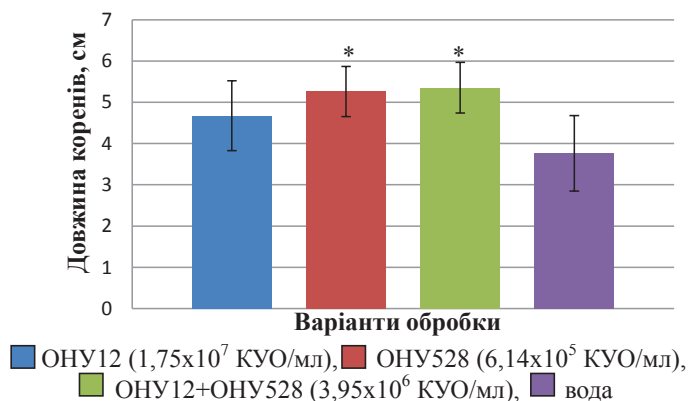


Рис. 7. Вплив бактерій *B. atrophaeus* ONU528 та *L. plantarum* ONU12 на середню довжину коренів пшениці

Примітка: * – різниця у порівнянні з контролем (водою) є достовірною ($p \leq 0,05$)

Fig. 7. Effect of the treatment with bacteria of *B. atrophaeus* ONU528 and *L. plantarum* ONU12 on mean length of wheat roots

Note: * – significant different from the control (water) ($p \leq 0,05$)

Обробка насіння бактеріями *L. plantarum* ОНУ12 в концентрації $1,75 \times 10^7$ КУО/мл не сприяла достовірному збільшенню довжини коренів та пагонів, у той час як обробка сумішшю *L. plantarum* ОНУ12 та *B. atrophaeus* ОНУ528 достовірно ($p \leq 0,05$) збільшувала середню довжину коренів на 42,3% ($5,4 \pm 0,6$ см), а надземних частин на 46,4% ($6,3 \pm 0,6$ см).

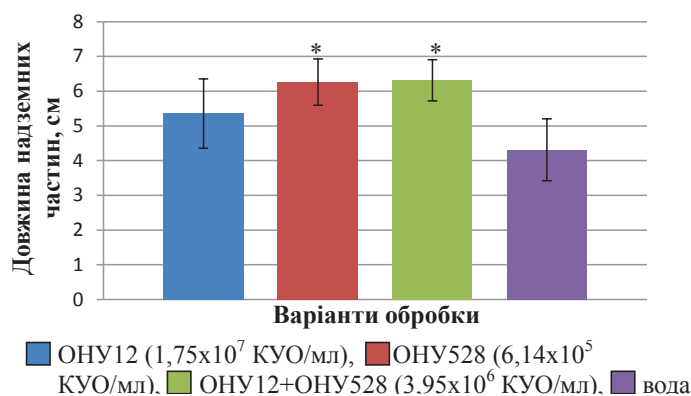


Рис.8. Вплив обробки бактеріями *B. atrophaeus* ОНУ528 та *L. plantarum* ОНУ12 на середню довжину надземних частин пшениці

Примітка: * – різниця у порівнянні з контролем (водою) є достовірною ($p \leq 0,05$)

Fig.8. Effect of the treatment with bacteria of *B. atrophaeus* ONU528 and *L. plantarum* ONU12 on mean height of wheat seedlings

Note: * – significant different from the control (water) ($p \leq 0,05$)

Таким чином, спостерігався неоднаковий вплив на ріст проростків пшениці бактерій різних штамів при подібних концентраціях клітин. Це свідчить про те, що стимулювальні властивості молочнокислих бактерій є штамоспецифічною ознакою. Стимулювальний вплив бактерій штаму *L. plantarum* ОНУ311 був виражений як на коренях так і на надземних частинах проростків. Стимулювальний вплив бактерій *L. plantarum* на ріст тест рослин було показано в наших попередніх роботах [11, 12]. Відомо, що фітостимулювальні мікроорганізми, продукують і виділяють екзометаболіти (ферменти, вітаміни, амінокислоти та інші важливі біологічно-активні речовини) чим забезпечують більш високу швидкість проростання насіння рослин та подальші процеси розвитку проростків [6]. Підвищене подовження коренів може призвести до покращення росту рослин шляхом кращого доступу до поживних речовин в ґрунті [9]. Стимулювальний вплив бактерій *L. plantarum* на кореневу систему та паростки (стимулювання на 20%) огірків сорту “Конкурент” показано в роботі Ржевської [5].

В той же час, стимулювальна активність бактерій *L. plantarum* ОНУ311 залежала від концентрації клітин. Інгибування росту проростків після збільшення концентрації бактеріальних клітин узгоджується з даними літератури, згідно з якими метаболіти мікроорганізмів, залежно від їх концентрації, можуть як пригнічувати, так і стимулювати ростові процеси. Це вірогідно пояснюється



синтезом ендогенних біологічно-активних речовин, в тому числі і фітогормонів, і порушенням балансу ендо- та екзогенних стимуляторів росту [6].

Комбінація бактерій двох штамів *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311 крім стимулювання росту проростків сприяла також достовірному ($p \leq 0,05$) збільшенню схожості насіння. Збільшення схожості насіння після обробки бактеріями консорціуму штамів *L. plantarum* було показано нами також в попередніх дослідженнях [7]. Відомо, що висока біологічна ефективність мікробних композицій може бути результатом адитивного ефекту, пов'язаного з взаємодією екзометаболітів обох штамів. Так, за даними літератури, позитивний вплив екзометаболітів гормональної природи на рослину підсилюється речовинами негормональної природи. Відомо також, що вітаміни та фенольні сполуки можуть позитивно впливати на ріст, розвиток та морфогенетичні процеси рослини, підсилюючи ефективність дії гормонів-стимуляторів, що дозволяє розглядати їх як клас регуляторів негормональної природи з синергічним типом дії [1]. Збільшення схожості насіння на 12% порівняно з контролем після обробки бактеріями *L. plantarum* було показано в експериментах на насінні огірків [5].

Результати експериментів з відмивкою бактеріальних клітин вказують на те, що як НОР так і відмиті бактерії сприяють росту коренів пшениці. Це можна пояснити присутністю фітогормонів або інших біологічно активних речовин в НОР, які продукують лактобацили під час культивування та також їх виділенням бактеріальними клітинами, якими було оброблено насіння. Так було показано, що молочнокислі бактерії можуть продукувати та секретувати значні кількості індолілоцтової кислоти (ІОК), фітогормону, який є важливим в стимулюванні росту [13]. Крім того, можливо припустити присутність 1-аміноциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) деамінази, що зменшує концентрацію АЦК в коренях рослин, знижує продукцію етилену в коренях та в свою чергу сприяє подовженню коріння як було описано для *Flavobacterium johnsoniae* JM162a та *Variovorax paradoxus* JM63 [9].

Збільшення довжини коренів та надземних частин проростків після обробки бактеріями штаму *B. atrophaeus* ОНУ528 підтверджує дані літератури про стимулювальний вплив штамів *B. atrophaeus* на рослини [15]. Стимулювальну активність на корені та надземні частини пшениці було встановлено також після обробки рідкою культурою *Bacillus subtilis* BZR517, яка зумовила на ранніх етапах вегетації статистично достовірне збільшення маси кореню на 38,0% порівняно з контролем але на пізніших етапах вегетації було відмічено стимулювальну дію на розвиток надземних частин: збільшення довжини та маси на 20,1 та 56,5%, відповідно [14].

Отже, встановлено, що бактерії штамів *L. plantarum* та *B. atrophaeus* ОНУ528 стимулюють проростання насіння та ріст рослин пшениці. Планується проведення подальших досліджень для вивчення природи рістстимулювальних речовин.

А.Г. Мерлич, Н.В. Лиманская, И.Д. Жунько, Д.О. Бабенко

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

ВЛИЯНИЕ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* И *BACILLUS ATROPHAEUS* НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН И РОСТ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Реферат

Цель. Изучение влияния бактерий штаммов *Lactobacillus plantarum* ОНУ12, ОНУ311 и *Bacillus atrophaeus* ОНУ528 на прорастание семян пшеницы и ростовые характеристики проростков. **Методы.** Бактеризация поверхностно простерилизованных семян разведенными культурами с последующим проращиванием во влажных камерах и измерением ростовых характеристик проростков. **Результаты.** Обработка *L. plantarum* ОНУ311 увеличивала длину корней проростков на 31% по сравнению с контролем и стимулирующее влияние на длину надземной части составляло 48%. Смесь бактерий штаммов *L. plantarum* ОНУ12 и ОНУ311 увеличивала длину корней и надземных частей проростков на 41,1 и 52,4% соответственно и повышала всхожесть семян на 25%. Обработка пшеницы бактериями *B. atrophaeus* ОНУ528 способствовала увеличению средней длины корней на 39,7% и надземных частей проростков на 45% по сравнению с контролем. **Выводы.** Бактерии *L. plantarum*, *B. atrophaeus* и их смесь проявили стимулирующее влияние как на корни так и на надземные части проростков пшеницы. Влияние лактобактерий зависело как от штаммов, использованных в эксперименте, так и от концентрации бактериальных клеток.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus atrophaeus*, стимулирующая активность, пшеница.

A.G. Merlich, N.V. Limanska, I.D. Zhunko, D.O. Babenko

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.:+38 (0482) 68 79 64; e-mail: andriymerlich@gmail.com

EFFECT OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* AND *BACILLUS ATROPHAEUS* ON GERMINATION OF WHEAT SEEDS AND SEEDLINGS GROWTH

Summary

Aim. Study of the effect of bacteria of the strains *Lactobacillus plantarum* ONU12, ONU311 and *Bacillus atrophaeus* ONU528 on germination of wheat seeds and growth characteristics of seedlings. **Methods.** Inoculation of surface sterilized seeds with the diluted cultures. The inoculated seeds were brought into wet cameras, and after germination the measurement of seedling growth characteristics were done. **Results.** The treatment by *L. plantarum* ONU311 resulted in increase of the length of seedlings roots in 31% as compared with the control and stimulation effect on the length of height



was 48%. The mixture of the strains *L. plantarum* ONU12 and ONU311 increased the length of roots and height of the seedlings in 41.1 and 52.4% accordingly, and seeds germination – in 25%. The treatment of wheat seeds by bacteria *B. atrophaeus* ONU528 resulted in increase of mean length of roots in 39.7% and height of seedlings in 45% as compared with the control. **Conclusions.** Bacteria *L. plantarum*, *B. atrophaeus* and their mixtures had the stimulation effect both on roots and height of wheat seedlings. The influence of lactic acid bacteria depended both on the strains and concentrations of bacterial cells.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus atrophaeus*, stimulation activity, wheat.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Драгозов І.В., Пасічник Л.А., Жукова Д.А., Лана С.В., Крючкова Л.О., Авдєєва Л.В. Антагоністична активність штамів *Bacillus amyloliquefaciens* – перспективних агентів біоконтролю зернових культур // Мікробіологічний журнал. – 2014. – № 5, Т. 76. – С. 15–19.
2. Завалин А.А. Биопрепараты, удобрения и урожай. М.: ВНИИА, 2005. – с. 302.
3. Захарова Н.Г. Создание биопрепаратов, перспективных для сельского хозяйства // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия Естественные науки. – 2006. – Т. 148. – книга 2. – С. 102–112.
4. Лапицкая Е.А., Петров В.Б., Никонов Е.Н., Кряжевских Л.А., Ланте Г.Ю. Препарат «Биотроф 600» стимулятор роста томатов // Аграрный вестник Урала. – 2008. – № 5. – С. 42–44.
5. Ржевская В.С. Применение молочнокислых бактерий для стимуляции прорастания семян огурца // Тезисы докладов всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений». – 2013. – С. 1–400.
6. Ржевская В.С., Отурина И.П., Теплицкая Л.М. Изучение биологических свойств штаммов молочнокислых бактерий // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского, Серия «Биология, химия». – 2014. – №1, Т. 27 (66). – С. 145–160.
7. Філімонов В.М., Мерліч А.Г., Ліманська Н.В. Вплив консорціума штамів *Lactobacillus plantarum* на ростові характеристики паростків салату *Lactuca sativa* L. // Вісник ОНУ. Біологія. – 2016. – Т. 21, Вип. 1(38). – С. 143–152.
8. Abdel-Aziz S.M., Moustafa Y.A., and Hamed H.A. Lactic acid bacteria in the green biocontrol against some phytopathogenic fungi: treatment of tomato seeds // Journal of Basic and Applied Scientific Research. – 2014. – V. 4 (12). – P. 1–9.
9. Golding A.-L., Zou Y., Yang X., Flynn B., Dong Zh. Plant growth promoting H₂ – oxidizing bacteria as seed inoculants for cereal crops // Agricultural Sciences. – 2012. – V. 3, №4. – P. 510–516.
10. Kang S. M., Radhakrishnan R., You Y.-H., Khan A.L., Park J.-M., Lee S.-M. and Lee I.-J. Cucumber performance is improved by inoculation with plant growth – promoting microorganisms // Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil and Plant Science. – 2015. – V. 65, I. 1. – P. 36–44.



11. *Limanska N., Ivanytsia T., Basiul O., Krylova K., Biscola V., Chobert J.-M., Ivanytsia V., Haertlé T.* Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2013. – V. 35, I. 5. – P. 1587–1595.
12. *Limanska N., Korotaeva N., Biscola V., Ivanytsia T., Merlich A., Franco BDGM, Chobert G. M., Ivanytsia V. and Haertlé T.* Study of potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Pathology & Microbiology*. – 2015. – V. 6, Issue 8. – P. 1–9.
13. *Shrestha A, Kim B.S., Park D.H.* Biological control of bacterial spot disease and plant growth-promoting effects of lactic acid bacteria on pepper // *Biocontrol Science and Technology*. – 2014. – V. 24, № 7. – P. 763–779.
14. <http://www.findpatent.ru/patent/255/2552146.html>
15. <http://www.findpatent.ru/patent/257/2570624.html>

References

1. Dragovoz IV, Pasichnyk LA, Zhukova DA, Lapa SV, Kriuchkova LO, Avdeeva LV Antagonistic activity of strains of *Bacillus amyloliquefaciens* – perspective agents of biocontrol of grain crops. *Mikrobiologichnyi zhurnal*. 2014, 5, 76, 15 – 19 (In Ukrainian).
2. Zavalin AA Biopreparations, fertilizers and harvest. VNIIA, M, 2005, 302 (In Russian).
3. Zaharova NG Creation of biopreparations, perspective for agriculture. *Uchenye zapiski Kazanskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Estestvennye nauki*. 2006, 148, 2, 102 – 112 (In Russian).
4. Lapickaia EA, Petrov VB, Nikonov EN, Kriazhevskih LA, Lapte GIu Preparation «Biotroph 600» stimulator of growth of tomatoes. *Agrarnyi vestnik Urala*. 2008, 5, 42 – 44 (In Russian).
5. Rzhavskaia VS Application of lactic acid bacteria for stimulation of germination of cucumber seeds. *Tezisy dokladov vserossiiskoi nauchnoi konferencii s mezhdunarodnym uchastiem «Innovacionnye napravleniia sovremennoi fiziologii rastenii»*. 2013, 1 – 400 (In Russian).
6. Rzhavskaia VS, Oturina IP, Teplickaia LM Study of biological properties of strains of lactic acid bacteria. *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacionalnogo universiteta im. V. I. Vernadskogo, Seriya «Biologiya, khimiia»*. 2014, 1, 27 (66), 145 – 160 (In Russian).
7. Philimonov VM, Merlich AG, Limanska NV Effect of the consortium of strains *Lactobacillus plantarum* on growth characteristic of sprouts of salad *Lactuca sativa* L. *Visnyk ONU. Biologiya*. 2016, 21, 1(38), 143 – 152 (In Ukrainian).
8. Abdel-Aziz SM, Moustafa YA, and Hamed HA Lactic acid bacteria in the green biocontrol against some phytopathogenic fungi: treatment of tomato seeds. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*. 2014, 4 (12), 1 – 9.
9. Golding A-L, Zou Y, Yang X, Flynn B, Dong Zh Plant growth promoting H₂ – oxidizing bacteria as seed inoculants for cereal crops. *Agricultural Sciences*. 2012, 3, 4, 510 – 516.



10. Kang SM, Radhakrishnan R, You Y-H, Khan AL, Park J-M, Lee S-M and Lee IJ Cucumber performance is improved by inoculation with plant growth – promoting microorganisms. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil and Plant Science*. 2015, 65, 1, 36 – 44.

11. Limanska N, Ivanytsia T, Basiul O, Krylova K, Biscola V, Chobert J-M, Ivanytsia V, Haertlé T Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013, 35, 5, 1587-1595.

12. Limanska N, Korotaeva N, Biscola V, Ivanytsia T, Merlich A, Franco BDGM, Chobert GM, Ivanytsia V and Haertlé T Study of potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Pathology & Microbiology*. 2015, 6, 8, 1 – 9.

13. Shrestha A, Kim BS, Park DH Biological control of bacterial spot disease and plant growth – promoting effects of lactic acid bacteria on pepper. *Biocontrol Science and Technology*. 2014, 24, 7, 763 – 779.

14. <http://www.findpatent.ru/patent/255/2552146.html>

15. <http://www.findpatent.ru/patent/257/2570624.html>

Стаття надійшла до редакції 08.02.2017 р.



В.В. Круть, Л.А. ДанкевичІнститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. академіка Заболотного, 154, Київ, Україна, 03143,
тел.: +38 (044) 526 11 79, e-mail: kroust.vol@gmail.com

ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ЛІПІДІВ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*

Метою досліджень був порівняльний аналіз жирнокислотного складу ліпідів ізольованих та колекційних штамів бактерій роду *Bacillus*. **Методи.** Склад жирних кислот клітинних ліпідів визначали методом газової хромато-мас-спектрометрії; обчислення середнього значення, стандартного відхилення і довірчого інтервалу здійснювали за допомогою Microsoft Excel. **Результати.** Вперше у жирнокислотних спектрах ізольованих *Bacillus* sp. та колекційних штамів *Bacillus thuringiensis* виявлено характерний для представників роду *Bacillus* набір жирних кислот з довжиною вуглецевого ланцюга від C_{10} до C_{18} атомів і зокрема великий вміст (понад 60–70% від загальної площі піків) розгалужених (*iso*- та *anteiso*- форм) жирних кислот. **Висновки.** За жирнокислотними профілями, виділені нами штами *Bacillus* sp. значно споріднені з колекційними штамом, що належать до виду *Bacillus thuringiensis*.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus* sp., жирні кислоти, ідентифікація.

Ентомопатогенні властивості штамів *Bacillus thuringiensis* широко використовують у сільському господарстві з метою контролю листогризух шкідників, у молекулярній біології для створення безпечних генетично модифікованих культурних рослин та у епідеміології для контролю чисельності популяцій комах-переносників хвороб [2, 3, 6]. Нажаль, спектр вітчизняних біопрепаратів, є вкрай обмеженим [3]. Тому пошук нових штамів, а також напрямків і способів їх застосування є одним із найбільш важливих завдань для сучасної вітчизняної мікробіології та біотехнології. Зважаючи на зазначене вище, попередньо, нами із сільськогосподарських угідь, що не зазнавали впливу ні хімічних, ні біологічних препаратів було ізольовано більше 40 штамів бактерій роду *Bacillus*, з яких 9 мали ентомопатогенні властивості. Проведено первинну ідентифікацію їх за ключовими ознаками фенотипу та встановлено їх значну спорідненість з типовими представниками роду *Bacillus*, зокрема і виду *Bacillus thuringiensis* [1]. Але для уточнення їх видового статусу, на наш погляд, необхідно залучення інших ознак фенотипу. Тому, метою наших досліджень був аналіз жирнокислотного складу ліпідів ізольованих нами та колекційних штамів бактерій роду *Bacillus*.

© В.В. Круть, Л.А. Данкевич, 2017



Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були штами, ізолювані нами із кишківника листо-гризучих комах, а саме із тканин личинок колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata*, ряд *Coleoptera*) та американського білого метелика (*Hyphantria cunea* Dryri, ряд *Lepidoptera*). Відбір комах проводили на полях приватних господарств та науково-дослідних установ на території Київської, Черкаської, Житомирської областей та АР Крим. Для порівняльного аналізу в роботі використано колекційні штами *B. thuringiensis* 297, 293, та 239, що були надані нам Патиною Т.І. (Національний університет біоресурсів та природокористування України). Колекційні штами *B. thuringiensis* В 5681, *B. megaterium* В 5714, *B. cereus* В 5650 та *B. sphaericus* В 5901, люб'язно надані з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології НАН України, та *B. thuringiensis* 98, що становить основу ентомоцидного препарату Бітоксубацилін [3], використали для порівняння.

Для визначення жирнокислотного складу ліпідів штами культивували на картопляному агарі протягом 24 годин при температурі 28 °С. Метилі ефіри жирних кислот отримували шляхом гідролізу клітин бактерій в 1,5% розчині сульфатної кислоти у метанолі протягом години за 80 °С з подальшою екстракцією сумішшю ефір-гексан (1:1) [5]. Склад метилових ефірів жирних кислот аналізували методом газової хроматографії хромато-мас-спектрометрії з використанням хромато-мас-спектрометричної системи Agilent 6800N/5973 inert (Agilent Technologies, США). Метилі ефіри жирних кислот ідентифікували з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02 та за часом їх утримання із використанням стандарту метилових ефірів жирних кислот (47080-U, Supelco, США). Вміст жирних кислот виражали у відсотках від загальної суми площі піків. Повторність дослідів 3-х кратна. Статистичне опрацювання результатів (середнє значення, стандартне відхилення і довірчий інтервал) здійснювали за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення

В жирнокислотних спектрах досліджуваних штамів виявлені жирні кислоти з довжиною вуглецевого ланцюга від C_{10} до C_{18} , а саме: ненасичені – гексадецену ($C_{16:1}$) (до $6,61 \pm 1,1$), 15 – метил гексадецену ($C_{17:1 iso}$) (до $4,51 \pm 0,1$) та *cis*-9 октадецену ($C_{18:1 cis 9}$) (до $0,41 \pm 0,21$) кислоти; насичені – додекану ($C_{12:0}$) (до $1,92 \pm 0,1$), 11-метил додекану ($C_{13:0 iso}$) (до $6,21 \pm 0,4$), тридекану ($C_{13:0}$) (до $1,82 \pm 0,1$), 12-метил тридекану ($C_{14:0 iso}$) (від $5,56 \pm 0,1$ до $16,83 \pm 0,1$), тетрадекану ($C_{14:0}$) (до $8,23 \pm 0,3$), 13-метил тетрадекану ($C_{15:0 iso}$) (від $3,72 \pm 0,1$ до $27,32 \pm 0,3$), 12-метил тетрадекану ($C_{15:0 anteiso}$) (від $2,82 \pm 0,3$ до $42,92 \pm 0,1$), пентадекану ($C_{15:0}$) (до $1,33 \pm 0,1$), гексадекану ($C_{16:0}$) (від $2,83 \pm 0,1$ до $12,23 \pm 1,0$), 14-метил пентадекану ($C_{16:0 iso}$) (від $4,49 \pm 0,3$ до $44,74 \pm 0,5$), 15-метил гексадекану ($C_{17:0 iso}$) (до $13,51 \pm 1,0$), 14-метил гексадекану ($C_{17:0 anteiso}$) (до $7,06 \pm 0,1$), октадекану ($C_{18:0}$) (слідові кількості).

Слід відмітити, що характерною особливістю жирнокислотних профілів як ізолюваних нами так і колекційних штамів є великий вміст розгалужених жирних кислот (*iso*- та *anteiso*- форми) (табл.), що згідно даних літератури властиво



Таблиця
Table

Жиринокислотний склад ліпідів колекційних та ізольованих штамів бактерій роду *Vacillus*

Cellular fatty acid composition of collection and isolated strains of the genus *Vacillus*

Жиринокислота*	Штам <i>Vacillus</i> sp.									<i>B. thuringiensis</i> 98	<i>B. thuringiensis</i> B 5681	<i>B. megaterium</i> B 5714	<i>B. cereus</i> B 5650 ^T	<i>B. sphaericus</i> B 5901 ^T	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9						
1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
C _{12:0}	0,59	0,91	1,02	0,83	0,79	1,25	1,22	0,78	0,91	0,84	0,52	-	-	0,35	-
C _{13:0 iso}	1,62	1,18	1,18	1,31	2,08	1,60	1,44	1,81	1,52	1,44	6,21	-	-	1,56	-
C _{13:0}	1,90	1,54	1,31	1,51	2,04	1,64	1,46	1,81	1,78	1,01	1,06	-	-	1,82	-
C _{14:0 iso}	7,51	11,64	11,97	10,65	9,03	13,08	13,99	9,04	12,68	9,89	6,27	5,56	5,56	8,17	16,83
C _{14:0}	8,36	7,62	8,69	8,82	8,52	7,82	6,61	7,73	8,08	7,98	3,08	-	-	3,50	-
C _{15:0 iso}	14,57	11,62	9,68	11,21	12,99	10,79	10,22	12,63	12,10	12,08	27,32	13,33	13,33	22,38	3,72
C _{15:0 anteiso}	7,85	6,77	6,20	6,94	8,99	7,59	7,10	9,02	7,98	7,20	10,73	42,92	42,92	11,81	2,82
C _{15:0}	1,54	1,29	1,45	1,40	1,27	1,25	1,18	1,30	1,29	1,23	0,42	1,26	1,26	0,94	-
C _{16:1}	2,55	7,09	6,03	5,13	3,30	7,32	8,58	4,13	3,29	6,90	5,33	-	-	4,35	-
C _{16:0 iso}	8,50	12,15	13,89	11,38	9,06	11,73	12,74	9,04	12,98	9,76	4,49	12,15	12,15	8,86	44,74



Продовження таблиці

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1														
C _{16:0 anteiso}	3,01	2,24	1,98	2,37	2,46	1,72	1,81	2,33	2,01	2,04	3,76	9,67	7,27	2,83
C _{16:0}	14,35	10,75	13,53	13,04	13,38	11,35	9,82	12,79	11,04	12,95	4,51	3,38	-	-
C _{17:1 iso}	17,36	16,87	16,02	16,46	16,14	14,98	15,28	17,69	17,99	16,01	12,26	10,62	2,80	-
C _{17:0 iso}	1,88	1,34	1,29	1,51	1,77	1,16	1,23	2,06	2,01	1,16	1,40	7,06	4,43	-
C _{17:0 anteiso}	0,48	-	-	0,30	-	-	-	-	-	-	сл.	-	сл.	-
C _{18:1 cis 9}	0,41	-	-	-	-	-	-	-	0,20	-	0,52	-	0,35	-
C _{18:0}	0,55	0,37	0,45	0,49	0,32	0,38	0,36	0,85	0,47	0,23	6,21	-	1,56	-
Сума ненасичених жирних кислот	20,32	23,96	22,05	21,59	19,44	22,3	23,86	21,82	21,48	22,91	18,11	10,62	7,05	-
Довжина вуглецевого ланцюгу	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{14:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{14:0} до C _{16:0}

Примітка.* вміст жирних кислот вказаний у % від загальної площі піків, «сл.» – слідові кількості жирних кислот; «<->» – сполука не виявлена.
 Note.* The content of fatty acids shown in% of the peaks total area; “сл.” – trace amounts of fatty acids; “<->” – compound not found



для більшості видів у складі роду *Bacillus* [2, 4, 7, 8]. Зокрема, А. М. Остапчуком аналогічна закономірність була відмічена і при дослідженні комплексу генотипових та фенотипових властивостей штаму *Bacillus* sp. ONU14, що був віднесений до виду *B. thuringiensis* [2]. У виділених нами штамів вміст iso- та anteiso- форм жирних кислот становить близько 70%, що узгоджується з даними літератури. Зокрема, Л.А. Сафроною з колегами аналогічна закономірність відмічена при поліфазній таксономії штамів роду *Bacillus* з пробіотичними властивостями [4]. Автори відмітили великий вміст розгалужених жирних кислот (iso- та anteiso- форм пентадеканової та гептадеканової кислот), що становили близько 75–85% від загального жирнокислотного пулу [4]. Найбільш детально жирнокислотний склад клітинних ліпідів було досліджено Kaneda T [7]. Зокрема, він сформував основні закономірності жирнокислотних спектрів представників роду *Bacillus*. Так, за вмістом певних жирних кислот у профілях ключові види, що належать до цього роду можна поділити на шість груп (A–F). На його думку вирішальним для такої градації є вміст ненасичених, кількість певних розгалужених кислот та довжина вуглецевого ланцюгу наявних у спектрах жирних кислот. Так, групі E, до якої віднесено види *B. anthracis*, *B. cereus* і *B. thuringiensis* притаманна незначна кількість ненасичених жирних кислот (7–12%), домінування 13-метил тетрадеканової кислоти (19–31%) серед усіх розгалужених кислот і присутність у жирнокислотних спектрах кислот з 12–17 атомами вуглецю [7, 8], що не суперечить одержаним результатам.

Так, профілі жирних кислот ізольованих нами штамів загалом відповідають зазначеним вище закономірностям, зокрема: вміст ненасичених кислот складає (7,48%), 13-метил тетрадеканова кислота є переважальною і її кількість в середньому становить 16,5% від загальної площі піків. У складі жирних кислот клітинних ліпідів даних штамів переважають кислоти з довжиною вуглецевого ланцюгу від 12 до 17 атомів. Що правда, у жирнокислотних спектрах ізольованих штамів нами виявлено октадеканову жирну кислоту у кількостях менших за 1% від загальної площі піків. Крім того, дещо знижена кількість 13-метил тетрадеканової кислоти у ліпідах клітин ізольованих штамів, на наш погляд, може бути зумовлена методом екстрагування жирних кислот, умовами культивування тощо.

Отже, за згаданими вище характеристиками ізольовані нами штами *Bacillus* sp., штаму *B. thuringiensis* 98 та штами *B. thuringiensis* В 5681 і *B. megaterium* В 5714 досить споріднені. Натомість жирнокислотні профілі *B. megaterium* В 5714 та *Bacillus sphaericus* В 5901 мають дещо відмінні від наведених вище штамів характеристики жирнокислотних спектрів.

Таким чином, за результатами хемотаксономічного аналізу, ізольовані штами *Bacillus* sp. споріднені з окремими представниками роду *Bacillus*, зокрема виду *B. thuringiensis*. Враховуючи встановлену раніше значну подібність ключових морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей [1] ізольованих нами штамів *Bacillus* sp. та типових представників виду *B. thuringiensis* можна констатувати високу вірогідність належності ізольованих штамів до цього виду.



V.V. Krout, L.A. Dankevych

D.K. Zabolotny Institute of microbiology and virology of NAS of Ukraine,
154, Zabolotny str., 03143, Kyiv, Ukraine. tel.: +38 (044) 526 11 79,
e-mail: krout.vol@gmail.com

GENUS BACILLUS ENTOMOPATHOGENIC STRAINS FATTY ACID LIPID COMPOSITION

Summary

Aim. To conduct a comparative analysis of cellular fatty acids composition of isolated bacterial strains belongs to the genus *Bacillus*, that have pathogenic for insects properties, and some typical representatives of this family. **Methods.** Fatty acid composition of cellular lipids established by chromatography, gas chromatography-mass spectrometry; calculating the mean, standard deviation and the confidence interval was performed using Microsoft Excel. **Results.** In the fatty acid composition of all studied strains revealed typical of the genus *Bacillus* set of fatty acids with carbon chain length from C_{10} to C_{18} atoms and particularly high content (more than 60–70% of the total peak area) of the branched (iso- and anteiso- forms) fatty acids has been found for the first time. **Conclusions.** Fatty acid profiles isolated strains *Bacillus* sp. significantly similar with collection and typical strains belonging to the species *Bacillus thuringiensis*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus* sp., fatty acid, identification.

В.В. Круть, Л.А. Данкевич

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Заболотного,
154, 03143, Киев, Украина, тел.: +38 (044) 526 11 79,
e-mail: krout.vol@gmail.com

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНЫХ ЛИПИДОВ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Реферат

Целью исследований был сравнительный анализ жирнокислотного состава липидов изолированных и коллекционных штаммов бактерий рода *Bacillus*. **Методы.** Состав жирных кислот клеточных липидов определяли методом газовой хромато-масс-спектрометрии; вычисление среднего значения, стандартного отклонения и доверительного интервала проводили с помощью Microsoft Excel. **Результаты.** Впервые в жирнокислотных спектрах изолированных *Bacillus* sp. и коллекционных штаммов *Bacillus thuringiensis* определен характерный для представителей рода *Bacillus* набор жирных кислот с длиной углеродной цепи от C_{10} до C_{18} атомов и в частности большое содержание (более 60–70% от общей площади пиков) разветвленных (iso- и anteiso- форм) жирных кислот. **Выводы.** По жирнокислотным профилям, выделенные нами штаммы *Bacillus*



*sp. значительно родственны коллекционным штаммам, которые принадлежат к виду *Bacillus thuringiensis*.*

*Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sp.*, жирные кислоты, идентификация.*

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Круть В.В., Данкевич Л.А., Воцелко С.К., Патика В.П. Ідентифікація нових ентомопатогенних штамів бактерій роду *Bacillus* за ключовими ознаками фенотипу // *Агроекологічний журнал* – 2015. – № 2. – С. 112–116
2. Остапчук А.М. Молекулярно-біологічна характеристика та ідентифікація штаму *Bacillus sp.* ONU14 з ентомопатогенною активністю // *Мікробіологія і біотехнологія* – 2015. – № 1. – С. 6–13
3. Патика Т.І., Лісовий М.М., Патика М.В., Колодяжний О.Ю. Біоценологічні підходи при використанні ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* під час вегетації та в умовах зберігання продукції // *Мікробіологічний журнал* – 2016. – № 3 – С. 69–77.
4. Сафронова Л.А., Зелена Л.Б., Клочко В.В., Авдеева Л.В., Рева О.Н., Подгорский В.С. Гено- и фенотипическая характеристика штаммов бацилл – компонентов эндоспорина // *Мікробіологічний журнал* – 2012. – № 2. – С. 55–65.
5. Brian B.L., Gardner E.W. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas–liquid chromatography // *Appl. Microbiol.* – 1967. – Vol. 15, № 6. – P. 1499–1500
6. Gonzalez A., Diaz R., Diaz M., Borrero Y., Bruzon R.Y., Carreras B., Gato R. Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes // *Revista de biologia tropical* – 2011. – 59, N 3. – P. 1007–1016.
7. Kaneda T. Fatty acids on the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference // *Bacteriological reviews* – 1977. – N 2. – P. 391–418.
8. Slabbinck B., De Baets B., Dawyndt P., De Vos P. Towards large-scale FAME-based bacterial species identification using machine learning techniques // *Systematic and Applied Microbiology* – 2009. – № 32. – P. 163–176.

References

1. Krout VV, Dankevych LA, Votselko SK, Patyka VPh. Identification of new entomopathogenic strains which belongs to genus *Bacillus* on the basis of their key phenotypic features. *Agroecological journal*. 2015, 2, 112-116 (in Ukrainian)
2. Ostapchuk AM. Molecular – biological characteristics and identification of *Bacillus sp.* ONU14 strains with entomopathogenic activity. *Microbiology and biotechnology*. 2015, 1, 6-13 (in Ukrainian)
3. Patyka TI, Lesovoy NM, Patyka NV, Kolodjzhnyi AYU. Biocenological approaches using entomopathogenic bacteria of *Bacillus thuringiensis* the season growing potatoes and storage. *Mikrobiologichny zhurnal*. 2016, 3, 69-77 (in Ukrainian)



4. Safronova LA, Zelena LB, Klochko VV, Avdeeva LV, Reva ON, Pidgorskyi VS. Genotype and phenotypic characteristics of *Bacillus* strains – components of endospores. *Mikrobiologichny zhurnal*. 2012, 5, 55-65 (in Russian).

5. Brian BL, Gardner EW. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas-liquid chromatography. *Appl. Microbiol.* 1967, 15 (6), 1499–1500.

6. Gonzalez A, Diaz R, Diaz M, Borrero Y, Bruzon RY, Carreras B, Gato R. Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes. *Revista de biologia tropical*. 2011. 59 (3), 1007–1016.

7. Kaneda T. Fatty acids on the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriological reviews*. 1977, 2, P. 391 – 418.

8. Slabbinck B, De Baets B, Dawyndt P, De Vos P. Towards large-scale FAME-based bacterial species identification using machine learning techniques. *Systematic and Applied Microbiology*. 2009, 32, 163-176.

Стаття надійшла до редакції 17.10.2016 р.



УДК 579.26:635.1/8-035.2

Г.В. Ямборко¹, А.М. Остапчук¹, Ж.Ю. Сергєєва¹,
Л.М. Пилипенко², І.В. Пилипенко²¹Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: jamborko@mail.ru²Одеська національна академія харчових технологій, вул. Канатна, 112, Одеса, 65039, Україна

ХЕМОТАКСОНОМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА ПЛАЗМІДНІ ПРОФІЛІ АЕРОБНИХ ТА ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЕРОБНИХ СПОРОУТВОРЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ З ОВОЧЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ

Мета. Визначити деякі молекулярно-генетичні особливості потенційних збудників харчових отруєнь, псування і залишкової мікрофлори овочевих продуктів – аеробних та факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій за їх хемотаксономічними та плазмідними профілями. **Методи.** Аналіз жирних кислот досліджуваних штамів проводили методом газової хроматографії з використанням системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, USA). Видову належність штамів бацил, які за даними хроматографії жирних кислот мали високі, але близькі значення індексів схожості за видами *Bacillus cereus* та *B. thuringiensis*, підтверджували проведенням полімеразної ланцюгової реакції з групо- та видоспецифічними праймерами. Виділення плазмідної ДНК проводили модифікованим методом Дженсена. **Результати.** Аналіз результатів хроматографічних досліджень показав, що вміст розгалужених жирних кислот у досліджених штамів становив від 54 до 85 % від загального жирнокислотного пулу клітин, включаючи насичені та ненасичені кислоти, а також їх розгалужені структурні ізомери з переважанням ізо- $C_{15}:0$ і антеізо- $C_{15}:0$ жирних кислот. Також для досліджуваних штамів характерний високий вміст антеізо- $C_{17}:0$ та ізо- $C_{17}:0$ жирних кислот. Переважно штами видів *B. cereus*, *Lysinibacillus sphaericus* та *B. pumilus* утримують плазмідні різного розміру, які представлені двома типами: невеликі плазмідні розміром від 2 до 12 т.п.о. і мегаплазмідні приблизно 200 т.п.о. **Висновки.** Досліджені штами бактерій за хемотаксономічними властивостями належали до 4 родів порядку Bacillales: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus* з переважанням представників першої рРНК групи та домінуванням штамів виду *B. subtilis*. Результати жирнокислотного біомаркування штамів *Bacillus cereus* підтверджено методом ПЛР з групо- та видоспецифічними праймерами для зразків, які за результатами хроматографії жирних кислот мали високі, але близькі значення індексів схожості за видами *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Відмічені особливості жирнокислотного та плазмідного профілів досліджуваних мікроорганізмів можуть бути використані як допоміжний ключ для таксономічного розмежування бациллярних контамінантів – потенційних збудників харчових захворювань, псування і залишкової мікробіоти овочевої продукції півдня України.

Ключові слова: бациллярні контамінанти, склад жирних кислот, полімеразно-ланцюгова реакція, ідентифікація, плазмідні профілі.

© Г.В. Ямборко, А.М. Остапчук, Ж.Ю. Сергєєва, Л.М. Пилипенко, І.В. Пилипенко, 2017



В останні роки значна увага приділяється вивченню мікробних контамінантів харчових продуктів, напівфабрикатів і сировини з метою визначення їх харчової безпечності і відповідності принципам НАССР [1, 2]. Серед біологічних властивостей термостійких бактерій, особливу увагу привертає здатність певних їх видів спричиняти псування продукції та харчові отруєння. Зокрема, в США за даними Центру з контролю і профілактики захворювань значна частина зумовлена *Bacillus cereus*. При харчових токсикоінфекціях у низці випадків пацієнтам помилково діагностують як причину інтоксикації *Staphylococcus aureus* та *Clostridium perfringens* [3].

Мікробіота овочевої сировини різноманітна, однак, переважно виділяються аеробні та факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії – представники порядку *Bacillales* [4]. Постійно уточнюється класифікація мікроорганізмів роду *Bacillus* [5]. Серед них є збудники псування харчової сировини і продукції [1] і збудники харчових отруєнь [6, 7], а розроблення режимів термічної обробки харчових продуктів проводиться з урахуванням виживання термостійких видів мікроорганізмів [8]. Тому ідентифікація бацилярних контамінантів овочевої сировини та продуктів її переробки українського регіону має наукове і практичне значення.

Методи ідентифікації мікроорганізмів, що є стандартизованими в Україні та обов'язковими до використання на харчових підприємствах, пов'язані з вивченням морфо-фізіологічних, тінкторіальних та біохімічних властивостей мікроорганізмів у критичних контрольних точках технологічного процесу або залишкової мікробіоти продукції. Якісний та кількісний вміст жирних кислот мікроорганізмів є добре відтворюваною стабільною і відносно постійною індивідуальною його характеристикою. Саме тому жирнокислотний профіль бактерій можна використовувати як фінгерпринт [9, 10].

Своєчасне виділення та ідентифікація бацил – представників мікробіоти овочевої сировини та продуктів її переробки – є необхідним кроком для прогнозування і забезпечення якості овочевої продукції та дозволяє оперативно вносити корективи у технологічний процес для гарантування відповідності продуктів харчування вітчизняним та міжнародним стандартам. Тому метою роботи було визначити деякі молекулярно-генетичні особливості потенційних збудників харчових отруєнь, псування і залишкової мікробіоти овочевих продуктів – аеробних та факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій за їх хемотаксономічними та плазмідними профілями.

Матеріали і методи

Як матеріал дослідження використовували рослинну сировину, районовану в Україні та вирощену в Одеській області (морква, буряк, кабачки, баклажани), овочі відварені стерилізовані у вакуумних полімерних пакетах, сушені суміші овочів і трав та грибні консерви з ознаками псування. Для виділення аеробних і факультативно-анаеробних бактерій середню пробу прогрівали протягом 20 хв за температури $80 \pm 1^\circ\text{C}$ та після охолодження до кімнатної температури



висівали на м'ясо-пептонний агар з подальшим інкубуванням за температури 30 ± 1 °C впродовж 24–48 год [11].

Чисті культури факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій (n=31) вирощували на трипсин-соєвому агарі (Tryptic soy agar, Merck, Germany) при 28 ± 1 °C впродовж 24 год. Підготовку проб та хроматографічне розділення метилових ефірів жирних кислот здійснювали згідно стандартного протоколу. 50 мг вологої мікробної біомаси поміщали у скляні віали для подальшого руйнування клітин та омилення ліпідів мікроорганізмів. Хімічний лізис клітин та омилення проводили з 1 мл 1,125 М розчину NaOH в метанолі при 100 °C протягом 30 хв. Для наступного етапу – етерифікації у зразок вносили 2 мл 6,0 N HCl в метанолі. Реакцію проводили при 80 °C впродовж 10 хв. Метилові ефіри жирних кислот екстрагували гексаном. Проби нейтралізували 0,3 М NaOH. Хроматографічне розділення проводили на газовому хроматографі Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA), колонка капілярна ULTRA 2 (25 м x 0,2 мм x 0,33 мкм), детектор полум'яно-іонізаційний, як газ-носії використовували водень. Пробу об'ємом 2 мкл вводили в режимі split з коефіцієнтом 40:1, температура інжектора 250 °C. Розділення проводили в режимі програмування температури – початкова температура 170 °C з градієнтом 5 °C/хв до 270 °C [12].

Вміст кожної жирної кислоти виражали у відсотках від загальної суми площ піків усіх жирних кислот. Хроматографічні піки із значеннями меншими за 0,2% не враховували. Для ідентифікації досліджуваних штамів використовували бібліотеку RSTBA6 6.21.

Видову належність трьох штамів *Bacillus sp.*, які за даними хроматографії жирних кислот мали досить високі і близькі індекси схожості за видами *Bacillus cereus* та *Bacillus thuringiensis*, підтвердили проведенням полімеразної ланцюгової реакції з використанням групо- та видоспецифічних праймерів до послідовностей бацил за методом Park et al. [13]. Використовували наступні пари праймерів: до групи *B. cereus* B C G S H – 1 F G T G C G A A C C C A A T G G G T C T T C groEL B C G S H – 1 R C S T T G T T G T A C C A C T T G C T C; до виду *B. thuringiensis* B T J H – 1 F G C T T A C C A G G G A A A T T G G C A G gyrB B T J H – R A T C A A C G T C G G C G T C G G. Для швидкого виділення і очищення ДНК бактеріальних клітин використовували набір F1021 (SureFast® PREP Bacteria, CONGEN Biotechnologie GmbH, Germany). Склад суміші для проведення ПЛР: 10xПЛР буфер – 2 мкл, 50 mM MgCl₂ – 0,8 мкл, 2,5 mM дНТФ – 1,6 мкл, Taq-полімераза (5 Од/мкл) – 0,4 мкл. Цикли ПЛР: первинна денатурація – 94 °C 5 хв, 30 циклів ампліфікації при денатурації 94°C 30 сек, відпалі при 63 °C 30 сек, елонгації при 72°C 30 сек, та фінальна елонгація 72 °C 5 хв. Реакцію проводили в ампліфікаторі BioRad (США).

Виділення плазмідної ДНК проводили методом Дженсена, адаптованим для виділення плазмід бактерій роду *Bacillus* [14]. Біомасу клітин ресуспендували в 100 мкл буфера E (15% цукрози, 40 mM тріс-HCl, 2 mM EDTA pH 7,9). До суспензії додавали подвійний об'єм лізуючого буфера (3% додецилсульфат



натрія, 50мМ тріс-НСІ рН 12,5). Зразки інкубували за температури 60 °С впродовж 30 хв, після чого до лізату додавали 5 U протеїнази К і перемішували 20 разів. Далі інкубували 90 хв при 37 °С і після цього додавали 1 мл суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1) та ретельно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували на мікроцентрифузі при 11000 об/хв (8800g), 15 хв.

Результати та обговорення

У попередніх дослідженнях показано, що аеробні та факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії, виділені з овочевої сировини та продуктів її переробки, були попередньо ідентифіковані класичними методами за морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками [15].

Вивчення біологічних властивостей 31 штаму спороутворювальних бактерій овочевої сировини та консервів дозволило віднести їх до певних родів та видів порядку *Bacillales* [16]. Однак, біологічні особливості цих штамів викликають сумнів щодо точності їх ідентифікації за фенотипом, тому видову приналежність підтверджували проведенням жирнокислотного аналізу, порівнюючи їх з відомими стандартами, з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI inc., USA), застосовуючи бібліотечну базу даних.

Домінування розгалужених жирних кислот у жирнокислотному профілі є характерною ознакою бактерій порядку *Bacillales* [10, 17]. За літературними даними та результатами наших досліджень вміст розгалужених жирних кислот у бацил становив від 54 до 85% загального жирнокислотного пулу клітини, включаючи як насичені, так і ненасичені кислоти з переважанням ізо- $C_{15}:0$ і антеізо- $C_{15}:0$. Також для них є характерним високий вміст антеізо- $C_{17}:0$ і ізо- $C_{17}:0$ жирних кислот.

Аналіз хроматограми, представленої на рис. 1(а), показав, що у жирнокислотному профілі досліджуваного штаму *Bacillus sp.* П90-1 виявлено розгалужені структурні ізомери насичених жирних кислот (38,35%), із яких 33,48% припадає на 13-метилтетрадеканову кислоту ($C_{15}:0$ iso).

Частка 12-метилтетрадеканової кислоти ($C_{15}:0$ anteiso) від загальної площі піків складає 4,67%, ізомерів гептадеканової кислоти – 17,63%, з яких 2,49% припадає на 15-метил-6-гексадеканову кислоту ($C_{17}:1$ iso w10c), 7,17% ізомерів – на 15-метилгексадеканову кислоту ($C_{17}:0$ iso) та 5,82% 13-метил-7-гексадеканову кислоту ($C_{17}:1$ iso w9c), 1,11% – на 14-метилгексадеканову кислоту ($C_{17}:0$ anteiso). Нерозгалужені насичені жирні кислоти клітин досліджуваного штаму складають 61,65%. Частка жирних кислот з парною кількістю атомів вуглецю: тетрадеканової кислоти ($C_{14}:0$) та гексадеканової кислоти ($C_{16}:0$) складає відповідно 3,24% і 3,51%. Ізомерів ненасиченої гексадеканової жирної кислоти виявлено 6,04%, з яких 0,64% припадає на 9-гексадеканову кислоту ($C_{16}:1$ w7c), 5,19% – на ізомери 14-метилпентадеканової кислоти ($C_{16}:0$ iso) і 0,21% – на 5-гексадеканову кислоту ($C_{16}:1$ w11c). Профіль загальноклітинних



жирних кислот штаму *Bacillus sp.* П90-1 є аналогічним жирнокислотним профілям штамів *Bacillus sp.* П90-4, П90-9, Л3, Л6, Л7, які було розшифровано з використанням бібліотечної бази даних RTSBA6 6.21 програми MIDI Sherlock, та вищевказані штами ідентифіковано як *Bacillus cereus GC subgroup A* з високими індексами схожості – 0,641–0,876.

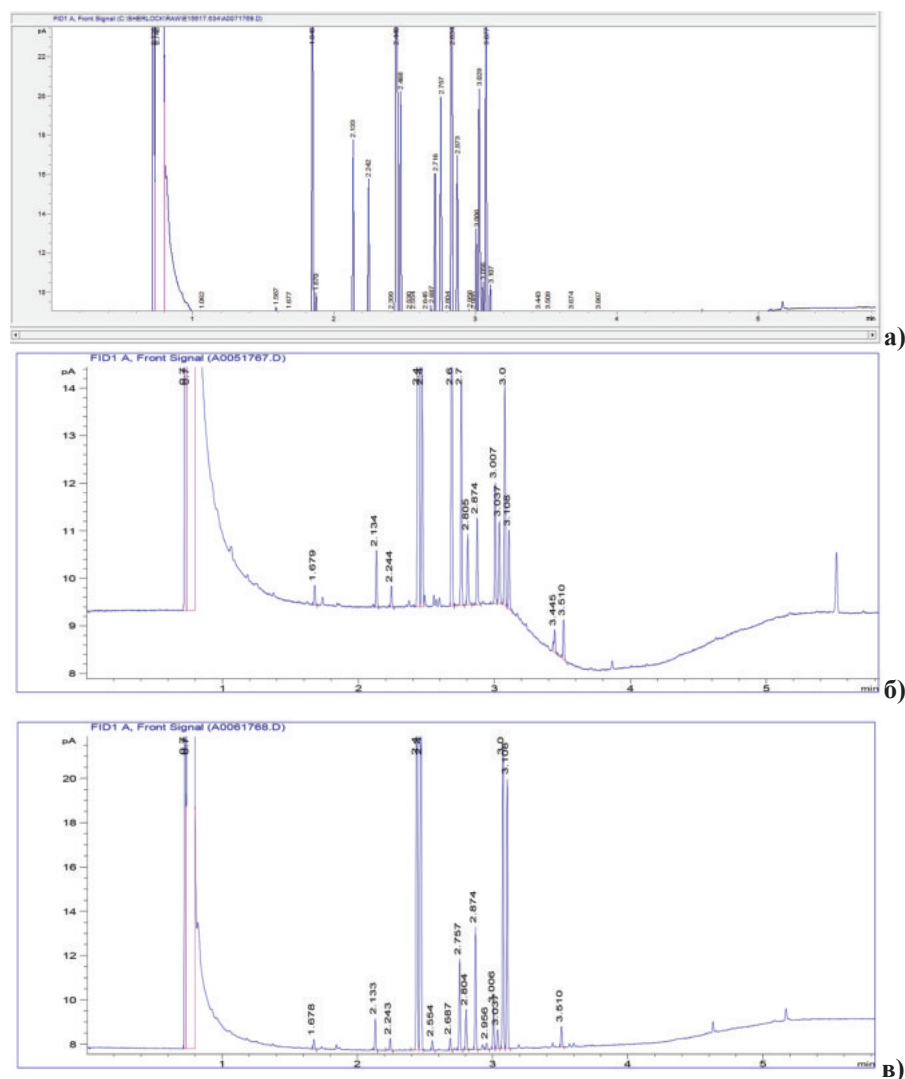


Рис. 1. Хроматограми жирних кислот загальних клітинних ліпідів штамів:

а) *Bacillus cereus* П90-1; б) *Lysinibacillus sphaericus* П90-2; в) *B. subtilis* П90-3.

Fig. 1. Chromatograms of fatty acids total cell lipids of the strains:

а) *Bacillus cereus* П90-1; б) *Lysinibacillus sphaericus* П90-2; в) *B. subtilis* П90-3.

Аналіз хроматограми, представленої на рис. 1(б), показав, що переважальним у жирнокислотному профілі досліджуваного штаму *Lysinibacillus sp.* П90-2 є розгалужені структурні ізомери насичених жирних кислот (62,31%), із яких 55,37% припадало на 13-метилтетрадеканову кислоту ($C_{15}:0$ iso). Жирнокислотні профілі штамів *Lysinibacillus sp.* П90-2, П90-8 та С1 характеризуються наявністю 21,04% ізомерів ненасиченої гексадекенової жирної кислоти, з яких 11,66% припадає на 9-гексадекенову кислоту ($C_{16}:1$ w7c), та відсутністю у клітинному складі гідроксикислот. Автоматичною системою ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, USA) за спектром жирних кислот досліджувані штами ідентифіковано як *L. sphaericus GC subgroup D* для штаму С1 та *L. sphaericus GC subgroup E* для штамів П90-2, П90-8 (індекси схожості – 0,723–0,906).

На відміну від *Bacillus sp.* П90-1 та *Lysinibacillus sp.* П90-2 штам *Bacillus sp.* П90-3 (рис. 1в) містить у складі профілю жирних кислот 33,77% ізомерів гептадеканової кислоти, з яких 12,66% припадає на $C_{17}:0$ iso та 11,11% – на $C_{17}:0$ anteiso) метилгексадеканові кислоти, відповідно. Переважальними в жирнокислотному профілі досліджуваного штаму *Bacillus sp.* П90-3 (а також штамів П90-5, ГС 1, ГС 2, ЯС- 1, КП- 14, К3, К4, К9) є розгалужені структурні ізомери насичених жирних кислот, із яких 34,39% припадає на 12-метилтетрадеканову кислоту ($C_{15}:0$ anteiso). За жирнокислотним складом досліджувані штами бацил цієї групи ідентифіковано як *Bacillus subtilis* з високими індексами схожості – 0,774–0,795. Вміст решти визначених жирних кислот та їх ізомерів серед досліджуваних штамів *B. subtilis* незначно відрізняється лише у кількісному складі.

Жирнокислотний профіль досліджуваного штаму *Bacillus sp.* П90-10 (рис. 2а) характеризується відсутністю олеїнової ($C_{18}:1$ w9c) кислоти. У складі жирнокислотного профілю цього штаму була ідентифікована 11-метилдодеканова кислота ($C_{13}:0$ iso) – 8,51%. Склад жирних кислот клітинних ліпідів штаму *Bacillus sp.* П90-7 є аналогічним штаму П90-10; обидва штами віднесено до виду *Bacillus pumilus-GC subgroup B*.

Жирнокислотний профіль досліджуваного штаму *Bacillus sp.* КК11 (рис. 2б) відрізняється від інших досліджених представників групи *Bacillus* меншою різноманітністю жирних кислот профілю клітин. Переважальними у жирнокислотному профілі *Bacillus sp.* КК11 (як і для штаму *Bacillus sp.* К5) є розгалужені структурні ізомери насичених жирних кислот, із яких 34,56% припадає на 12-метилтетрадеканову кислоту ($C_{15}:0$ anteiso). Штами *Bacillus sp.* КК11, К8 та К5 ідентифіковано як *Bacillus licheniformis* (індекси схожості – 0,774 та 0,795).

Розгалужені насичені жирні кислоти клітин штаму *Bacillus sp.* К6 (рис. 2в) складають 63,9% від усіх жирних кислот штаму. Частина жирних кислот з парною кількістю атомів вуглецю у вуглеводневому радикалі: тетрадеканової кислоти ($C_{14}:0$) та гексадеканової кислоти ($C_{16}:0$) складає відповідно 0,26% і 0,64%. Склад жирних кислот клітинних ліпідів штаму *Bacillus sp.* К6 був аналогічним штаму К7; обидва штами віднесено до виду *Bacillus atrophaeus*.

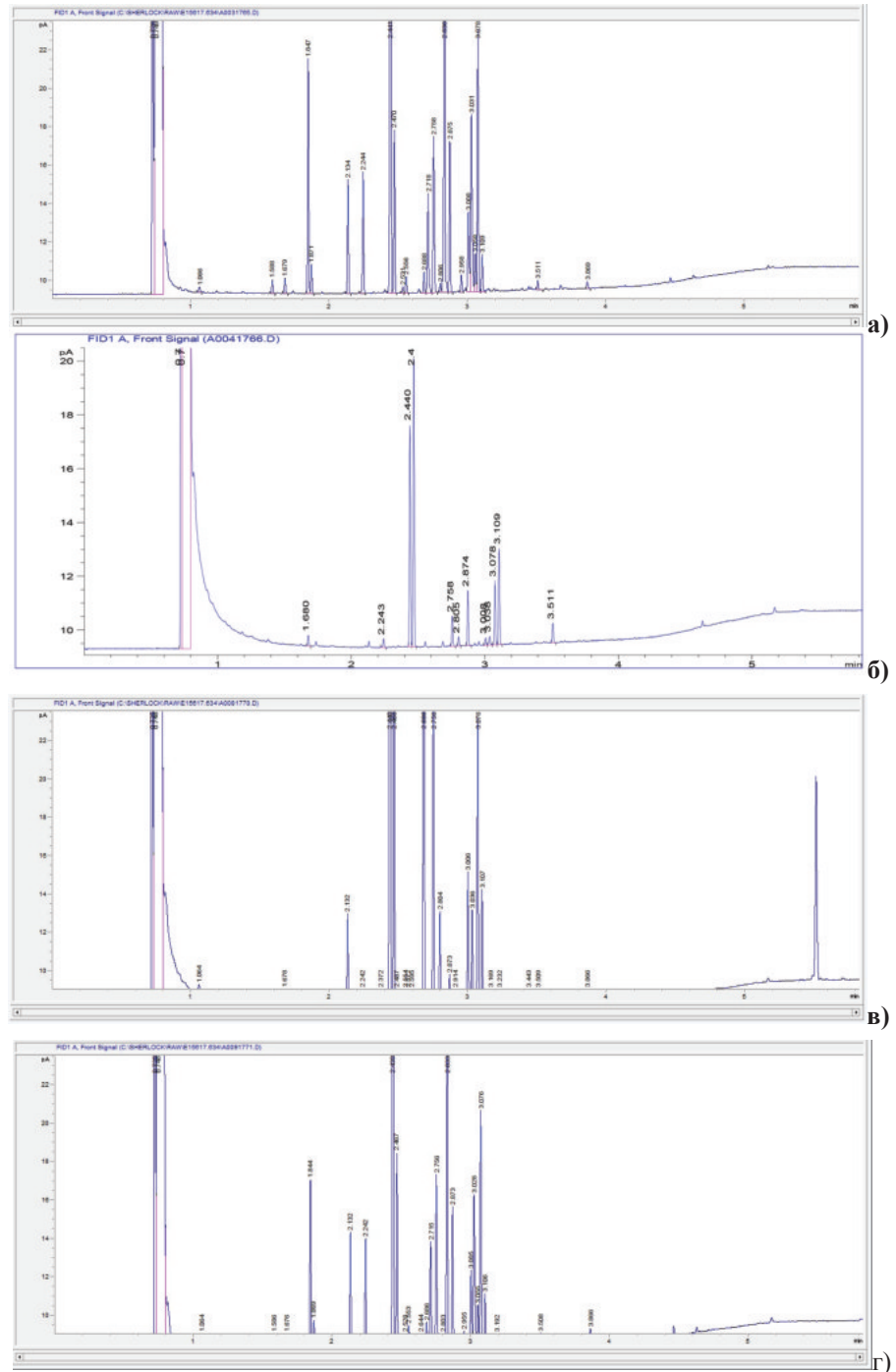


Рис. 2. Хроматограми жирних кислот загальних клітинних ліпідів штамів:
а) *Bacillus pumilus* П90-10; б) *B. licheniformis* КК11; в) *B. atrophaeus* К6;
г) *Brevibacillus choshinensis* С10.

Fig. 2. Chromatograms of fatty acids total cell lipids of the strains:
а) *Bacillus pumilus* П90-10; б) *B. licheniformis* КК11; в) *B. atrophaeus* К6;
г) *Brevibacillus choshinensis* С10.

Результати жирнокислотного складу деяких інших ізольованих штамів – представників родів *Lysinibacillus* і *Bacillus* наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Кількість основних жирних кислот (%) бактерій штамів родів
Lysinibacillus і *Bacillus*

Table 1

The main fatty acids (%) of some strains of bacteria *Lysinibacillus* and *Bacillus* genera

Жирна кислота	<i>Bacillus cereus</i> П90-4	<i>Bacillus subtilis</i> П90-5	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> GC subgroup D П90-8	<i>Bacillus atrophaeus</i> К7	<i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup B П90-7	<i>Bacillus licheniformis</i> К5
C ₁₂ :0	0,49	-	0,18	-	-	1,54
C ₁₃ :0 iso	6,97	-	-	-	0,33	-
C ₁₄ :0 iso	3,19	1,35	1,76	0,94	1,64	-
C ₁₄ :0	3,50	-	0,26	0,24	0,95	1,23
C ₁₅ :0 iso	34,95	24,92	55,93	15,93	36,77	26,94
C ₁₅ :0 anteiso	4,53	32,79	7,82	45,27	30,38	34,56
C ₁₆ :1w7c	0,61	-	12,11	-	0,42	-
C ₁₆ :0 iso	4,85	3,70	6,92	4,11	2,74	3,79
C ₁₆ :1 w11c	0,26	1,65	1,80	0,51	2,02	1,14
C ₁₆ :0	4,18	5,07	0,64	2,55	5,77	6,56
C ₁₇ :1 iso w10c	2,66	-	2,52	0,70	1,73	0,94
C ₁₇ :1 iso w9c	6,02	-	-	-	-	-
C ₁₇ :0 iso	7,50	12,66	5,14	7,81	5,42	7,77
C ₁₇ :0 anteiso	1,09	11,17	2,24	19,92	6,03	11,71
C ₁₈ :0	0,33	-	0,25	0,21	0,63	2,45

Примітка: «-» – не виявлена

Note: «-» – not determined.

Lysinibacillus sphaericus GC subgroup D П90-8 характеризується максимальною кількістю 13-метилтетрадеканової кислоти (C₁₅:0 iso) – 55,93%, 9-гексадекенової кислоти (C₁₆:1w7c) – 12,11% та гексадеканової кислоти (C₁₆:0 iso) – 6,92%, що незначно відрізняє його від штаму П90-2 (рис. 16).



Особливістю досліджуваного штаму *Bacillus atrophaeus* К7 є найбільша кількість 12-метилтетрадеканової кислоти (C₁₅:0 anteiso) – 45,27%. Лише у жирнокислотному профілі загальних ліпідів штаму *Bacillus cereus* П90-4 порівняно з іншими ізолятами зареєстровано 15-метил-7-гексадеканову кислоту (C₁₇:1 iso w9c).

Встановлено, що штам *Brevibacillus* sp. С10 характеризується найбільш різноманітним складом жирних кислот (рис. 2г). На відміну від решти досліджуваних штамів, у його жирнокислотному профілі виявлено гептадеканову кислоту (C₁₇:0) у кількості 0,22%. Нерозгалужені жирні кислоти тетра-(C₁₄:0) та гексадеканова (C₁₆:0) виявлені у кількості 3,60 та 4,40%, відповідно. Автоматичною системою ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock за спектром жирних кислот досліджуваний штам ідентифіковано як *Brevibacillus choshinensis* з високим індексом схожості – 0,854. Жирнокислотний склад деяких інших ізольованих штамів – представників родів *Paenibacillus* та *Brevibacillus* наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Кількість основних жирних кислот (%) бактерій штамів родів *Paenibacillus* і *Brevibacillus*

Table 2

The main fatty acids (%) of some strains of bacteria *Paenibacillus* and *Brevibacillus* genera

Жирна кислота	<i>Paenibacillus larvae</i> ssp. <i>pulvifaciens</i> ЯС-2	<i>Paenibacillus macerans</i> ГС 3	<i>Paenibacillus polymyxa</i> С12	<i>Brevibacillus choshinensis</i> С11
C ₁₄ :0 iso	-	-	-	3,87
C ₁₄ :0	0,98	-	-	1,05
C ₁₅ iso	22,24	22,26	15,37	8,68
C ₁₅ :0 anteiso	39,49	40,39	42,50	74,54
C ₁₆ :0 iso	2,22	1,69	2,63	1,25
C ₁₆ :1 w11c	-	-	-	2,18
C ₁₆ :0	9,89	9,12	16,35	2,03
C ₁₇ :0	-	-	-	0,17
C ₁₇ :0 iso	9,06	8,67	7,78	0,37
C ₁₇ :0 anteiso	10,49	14,49	12,97	1,88

Дослідженням штамам роду *Paenibacillus*, на відміну від штамів інших родів, властива найбільша кількість гексадеканової (C₁₆:0) та 14- метилгексадеканової (C₁₇:0 anteiso) кислот, та відсутністю у складі жирних кислот клітинних ліпі-



ХЕМОТАКСОНОМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА ПЛАЗМІДНІ ПРОФІЛІ ...

дів 12-метилтридеканової (C₁₄:0 iso), тетрадеканової (C₁₄:0) та 5-гексадецененової (C₁₆:1 w11c) кислот.

Таким чином, для досліджуваних штамів отримані високі індекси схожості, що дозволило виявити їх видову належність. Так, за результатами ідентифікації шляхом встановлення жирнокислотного складу клітин спороутворювальних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій, виділених з овочевої сировини та продуктів її переробки, вивчені штами належать до 4 родів порядку *Bacillales*: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* та *Brevibacillus* та віднесені згідно досліджень С. Ash зі співавторами [18] до 4 окремих груп за секвенування 16S рРНК (табл. 3).

Таблиця-3

Особливості жирнокислотного складу штамів бацил із вочевих продуктів

Table 3

Fatty acid composition of bacilli strains from vegetable products

Група рРНК	Вид	Кількість штамів	Особливості жирнокислотного складу
1	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> GC subgroup A, <i>B. licheniformis</i> <i>B. pumilus</i> GC subgroup B, <i>B. atrophaeus</i>	9 6 3 2 2	Жирнокислотний склад переважно представлений C ₁₅ :0 anteiso (25–66%), C ₁₅ :0 iso (22–47%), C ₁₇ :0 anteiso (2–12%) за винятком представників групи <i>B. cereus</i> , які характеризувалися підвищеним вмістом ненасичених жирних кислот (більше 10%) та меншим вмістом C ₁₅ :0 anteiso (7–12%)
2	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> GC subgroup E <i>L. sphaericus</i> GC subgroup D	2 1	У жирнокислотному складі переважали C ₁₅ :0 anteiso. Також характерним для цієї групи є наявність значної кількості ненасичених жирних кислот (17–28%)
3	<i>Paenibacillus larvae</i> ssp. <i>pulvifaciens</i> <i>P. macerans</i> <i>P. polymyxa</i>	1 2 2	Жирнокислотні профілі містили C ₁₅ :0 anteiso (66–80%), C ₁₆ :0 iso (3,5–6,6%), C ₁₅ :0 iso (10–12%) та C ₁₇ :0 anteiso (18–21%)
4	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	1	Характерний вміст C ₁₅ :0 iso (18–42%) та C ₁₅ :0 anteiso (32–62%)

Проведеними дослідженнями показано, що серед бацил овочевих продуктів найбільше представників першої рРНК групи з переважанням штамів виду *B. subtilis*. Ізольовані штами роду *Bacillus* за результатами жирнокислотного аналізу віднесені до видів *B. subtilis*, *B. cereus* GC subgroup A, *B. pumilus* GC subgroup B, *B. atrophaeus* та *Bacillus licheniformis*; роду *Lysinibacillus* – до виду *L. sphaericus* GC (subgroup E та D), роду *Brevibacillus* – до виду *B. choshinensis*, роду *Paenibacillus* – до видів *P. larvae* ssp. *pulvifaciens*, *P. macerans*, *P. polymyxa*.



З літературних джерел відомо, що представники групи *B. cereus* (види *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycooides*) характеризуються високим ступенем генетичної та фенотипової спорідненості [14,19]. За результатами жирнокислотного біомаркування деякі штами *Bacillus sp.* мають досить високі і близькі індекси схожості, наприклад у зразку П90-4 цей показник становить 0,806 для *B. cereus GC subgroup A* і 0,772 – для *B. thuringiensis israelensis*. Незважаючи на рекомендації щодо індикації виду мікроорганізмів за більшим значенням індексу, було додатково перевірено точність хемотаксономічного визначення проведенням полімеразної ланцюгової реакції з використанням групо- та видоспецифічних праймерів до послідовностей бацил.

У випадку проведення ПЛР з двома парами праймерів амплікони утворюються за застосування праймерів BCGSH, що свідчить про належність тестованих штамів до групи *B. cereus*. Розмір ампліконів становить 400 п.о., що вказує на належну специфічність ПЛР (рис. 3).

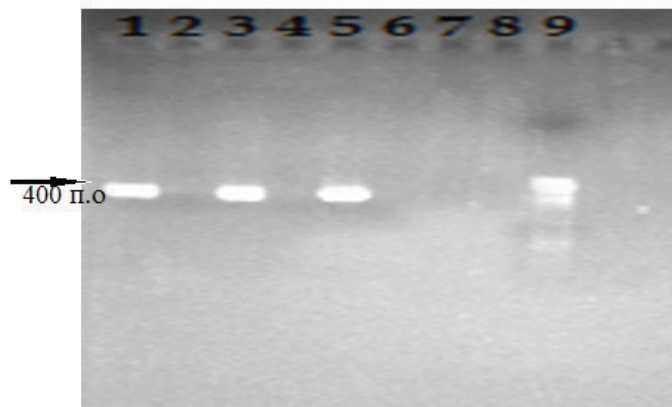


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР з ДНК штамів *Bacillus sp.* П90-1, П90-4 та П90-9:

1, 3, 5 – з парою праймерів до групи *B. cereus*; 2, 4, 6 – з парою праймерів до *B. thuringiensis*; 7 – негативний контроль ПЛР; 9 – маркери молекулярної маси (pBR322/BsuRI – 587, 540, 502, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 104, 89, 80 п.о., Fermentas).

Fig. 3. Electroforegram of PCR products with DNA *Bacillus sp.* П90-1, П90-4 and П90-9 strains:

1, 3, 5 – with *B. cereus* group-specific primers; 2, 4, 6 – with *B. thuringiensis* species-specific primers; 7 –negative control PCR; 9 – MW marker (pBR322/BsuRI – 587, 540, 502, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 104, 89, 80 b.p., Fermentas).

За використання праймерів до виду *B. thuringiensis* не було отримано жодного продукту ампліфікації. Отже, проведений молекулярно-біологічний аналіз ПЛР показує належність досліджених штамів *Bacillus sp.* П90-1, П90-4 та П90-9 до виду *B. cereus*, чим підтверджує результати хемотаксономічного визначення систематичного положення виділених штамів мікроорганізмів за жирнокислотним фінгерпринтом.

Плазмідні профілі є цінним інструментом для характеристики будь-яких бактерій, у тому числі багатьох бактерій роду *Bacillus*. Плазмідні профілі бактерій роду *Bacillus* можуть бути наявні у кількості від 1 до 17 на клітину і мати розмір від 3 до 200 т.п.о. [14, 19]. Вивчення плазмідоутримання та характеру плазмідних профілів бацил, виділених з харчових продуктів, показало, що переважно штами видів *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus sphaericus* та *B. pumilus* утримують плазмідні різного розміру, які можна розділити на дві окремі групи: маленькі плазмідні розміром приблизно 2, 5 і 12 т.п.н. і мегаплазмідні розміром приблизно 200 т.п.о. Мегаплазмідні бацил можуть відповідати за наявність різноманітних додаткових властивостей, наприклад, за наявність антагоністичної активності, резистентності до антибіотиків, синтез токсинів [14].

У штамів *B. cereus* П90-4 та П90-9 виявлені однакові за розміром плазмідні профілі (рис. 4, доріжки 6, 7). Розмір цих плазмід корелює з розміром маркерної плазмідної рСА 25::Tn 9 (доріжка 11) і становить за попередньою оцінкою 12 т.п.о.

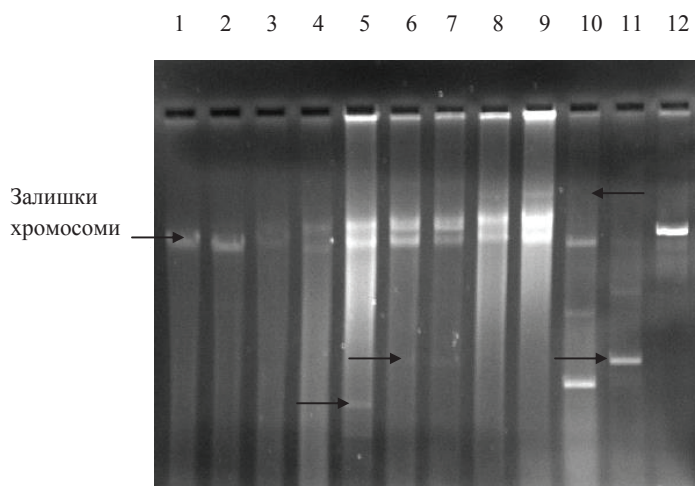


Рис. 4. Плазмідні профілі:

1 – *Bacillus subtilis* П90-3; 2 – *B. subtilis* ГС 2; 3 – *B. subtilis* ЯС- 1; 4 – *B. licheniformis* КП- 5; 5 – *B. pumilus* П90-7.; 6 – *B. cereus* П90-4, 7 – *B. cereus* П90-9; 8 – *L. sphaericus* П90-2; 9 – *L. sphaericus* П90-8; 10 – маркерна плазмідна рСА 25 (9,8 т.п.о.); 11 – маркерна плазмідна рСА 25::Tn 9 (12,5 т.п.о.), 12 – маркерна плазмідна РР4 (60 т.п.о.). Стрілками вказані позахромосомні ДНК.

Fig. 4. Plasmid profiles:

1 – *Bacillus subtilis* П90-3; 2 – *B. subtilis* ГС 2.; 3 – *B. subtilis* ЯС- 1; 4 – *B. licheniformis* КП- 5; 5 – *B. pumilus* П90-7.; 6 – *B. cereus* П90-4, 7 – *B. cereus* П90-9; 8 – *Lysinibacillus sphaericus* П90-2; 9 – *L. sphaericus* П90-8; 10 – marker plasmid pCA 25 (9800 bp); 11 – marker plasmid pCA 25::Tn 9 (12500 bp), 12 – marker plasmid RP4 (60000 bp). Arrows indicate on extrachromosomal DNA.

У *L. sphaericus* П90-2 і П90-8 були виявлені однакові за розміром великі плазмідні або мегаплазмідні (доріжки 8 і 9), наявність яких властива для бактерій роду *Lysinibacillus* і підтверджує результати хемотаксономічного аналізу даних

штамів. Розмір цих плазмід значно перевищує розмір маркерної плазмиди RP4 (доріжка 12) та за попередньою оцінкою може становити близько 200 т.п.о. Найменші за розміром плазмиди виявлені у штаму *B. pumilus* П90-7. Їх розміри менші за розмір маркерної плазмиди рСА 25 і складають за попередньою оцінкою 2 і 5 т.п.о. (доріжки 5 і 10).

Таким чином, досліджені штами бактерій за хемотаксономічними властивостями належать до 4 родів порядку *Bacillales*: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus* з переважанням представників першої рРНК групи та штамів виду *B. subtilis*. Результати жирнокислотного біомаркування штамів *Bacillus cereus* підтверджено методом ПЛР з групо- та видоспецифічними праймерами для зразків, які за даними хроматографії жирних кислот мали високі, але близькі значення індексів схожості за видами *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Вивчені плазмідні профілі бацил можуть слугувати цінним інструментом для диференціації специфічних штамів.

З використанням молекулярно-біологічних методів визначено характерні особливості та ідентифіковано штами термостійких аеробних і факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій – потенційних збудників харчових захворювань, псування і залишкової мікробіоти овочевої продукції півдня України.

А.В. Ямборко¹, А.Н. Остапчук¹, Ж.Ю. Сергеева¹,
Л.Н. Пилипенко², І.В. Пилипенко²

¹Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: jamborko@mail.ru

²Одесская национальная академия пищевых технологий, ул. Канатная, 112, Одесса, 65039, Украина

ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПЛАЗМИДНЫЕ ПРОФИЛИ АЭРОБНЫХ И ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ИЗ ОВОЩНОЙ ПРОДУКЦИИ

Реферат

Цель. Установить систематическое положение и некоторые молекулярно-генетические особенности потенциальных возбудителей пищевых отравлений, порчи и остаточной микрофлоры овощных продуктов – аэробных и факультативно-анаэробных спорообразующих бактерий по их хемотаксономическим и плазмидным профилям. **Методы.** Анализ жирных кислот исследуемых штаммов проводили методом газовой хроматографии с использованием системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock (MIDI, USA). Видовую принадлежность штаммов бацилл, которые по данным хроматографии жирных кислот имели высокие, но близкие значения индексов схожести между видами *Bacillus cereus* и *B. thuringiensis*, подтверждали проведением полимеразной цепной реакции с групо- и видоспецифическими праймерами. Выделение плазмидной ДНК проводили модифицированным методом Дженсена. **Результаты.** Анализ результатов



хроматографических исследований показал, что содержание разветвленных жирных кислот у исследованных штаммов составило от 54 до 85 % общего жирнокислотного пула клеток, включая ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты, а также их разветвленные структурные изомеры с преобладанием изо- $C_{15}:0$ и антеизо- $C_{15}:0$ жирных кислот. Также для них было характерно высокое содержание антеизо- $C_{17}:0$ и изо- $C_{17}:0$ жирных кислот. Преимущественно штаммы видов *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus sphaericus* и *B. subtilis* содержали плазмиды разного размера, которые относились к двум группам: небольшие плазмиды величиной от 2 до 12 т.п.о. и мегаплазмиды около 200 т.п.о. **Выводы.** Исследованные штаммы бактерий по хемотаксономическим свойствам принадлежали к 4 родам порядка Bacillales: *Bacillus*, *Raenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus* с преобладанием представителей первой группы рРНК и доминированием штаммов вида *B. subtilis*. Результаты жирнокислотной биоиндикации штаммов *Bacillus cereus* подтверждены методом ПЦР с группно – и видоспецифическими праймерами для образцов, которые по результатам хроматографии жирных кислот имели высокие, но близкие значения индексов сходства по видам *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Отмеченные особенности жирнокислотного и плазмидного профилей исследованных микроорганизмов могут быть использованы как вспомогательный ключ для таксономического разграничения бациллярных контаминантов – потенциальных возбудителей пищевых заболеваний, порчи и остаточной микрофлоры овощной продукции юга Украины.

Ключевые слова: бациллярные контаминанты, состав жирных кислот, полимеразно-цепная реакция, идентификация, плазмидные профили.

G.V. Yamborko¹, A.M. Ostapchuk¹, Zh.Yu. Sergieieva¹,
L.M. Pylypenko², I.V. Pylypenko¹

¹Odesa I. I. Mechnykov National University, 2, Dvoryanska st., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: jamborko@mail.ru

²Odesa National Academy of Food Technologies, 112, Kanatna st., Odesa, 65039, Ukraine

CHEMOTAXONOMIC FEATURES AND PLASMID PROFILES OF AEROBIC AND FACULTATIVE ANAEROBIC SPORE-FORMING BACTERIA FROM VEGETABLES

Summary

Aim. To set the systematic position and some molecular genetic characteristics of potential agents of food poisoning and spoilage microorganisms residual vegetable products – aerobic and facultative anaerobic spore-forming bacteria in their hemotaxonomic and plasmid profiles. **Methods.** The fatty acid analysis of the investigated strains was carried out by gas chromatography using the system identification of microorganisms MIDI Sherlock (MIDI, USA). The species belonging of bacilli strains that according to chromatography of fatty acids had high, but close similarity indices by types of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis*, was confirmed by conducting PCR with specific primers. Plasmid DNA isolation was performed by the modified Jensen's method. **Results.** The analysis of the results of gas chromatography showed that content of branched fatty acids in the investigated strains was from 54 to 85% of the total fatty acid cell pool, including saturated and unsaturated fatty acids and their branched structural isomers with a predominance of iso- $C_{15}:0$ and anteizo- $C_{15}:0$ fatty acids. It was also characterized for them a high content of anteizo- $C_{17}:0$



and iso-C₁₇:0 fatty acids. Mostly strains of *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus sphaericus* and *B. pumilus* contained plasmids of different sizes, which fell into two groups: the small plasmids from 2000 to 12000 bp and megaplasmids to 200000 bp. **Conclusion.** The investigated strains of bacteria due their chemotaxonomic features have belonged to 4 genera of Bacillales order: *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* with the predominance of the first group of rRNA representatives and the dominance of *B. subtilis* strains. The results of the fatty acid biomarking of *Bacillus cereus* strains have been confirmed by PCR with the group- and species-specific primers for the samples that according to fatty acids chromatography had high but similar indices of similarity between *B. cereus* and *B. thuringiensis* species. The peculiarities of fatty acid and plasmid profiles of investigated microorganisms can be used as an auxiliary key for taxonomic differentiation of bacillary contaminants – potential pathogens of foodborne diseases, damage and residual microbiota of vegetable production in the South of Ukraine.

Key words: bacillary contaminants, fatty acid composition, polymerase chain reaction, identification, plasmid profiles.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Клив де В. Блэбберн. Микробиологическая порча пищевых продуктов / Пер. с англ. – СПб.: Профессия, 2008. – 784 с.
2. Галынкин В.А., Заикина Н.А., Шевелева С.А. и др. Микробиологические основы НАССР при производстве пищевых продуктов. – С.-Пб.: Проспект науки, 2007. – 350 с.
3. Scallan E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. -A., Roy, S. L. et al. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens // *Emerg Infect Dis.* – 2011. – 17(1). – P. 7–15.
4. Connor N., Sikorski J., Rooney P. et al. Ecology of speciation of the genus *Bacillus* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – 76. – P. 1349–1358.
5. Джей Дж. М., Лёсснер Дж., Гольден Д. А. Современная пищевая микробиология. пер. 7-го англ. изд. — 2-е изд. (эл.). – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 886 с.
6. Biesta-Peters E.G., Dissel S., Reij M.W., Zwietering M. H., and Paul H. Characterization and Exposure Assessment of Emetic *Bacillus cereus* and Cereulide Production in Food Products on the Dutch Market // *Journal of Food Protection* February. –2016. – V. 79. – № 2. – P. 230–238
7. Flores-Urbá K., Natividad-Bonifaci I., Vázquez-Quñone, C., Vázquez-Sali, C., Quiñones-Ramírez E. Detection of Toxigenic *Bacillus cereus* Strains Isolated from Vegetables in Mexico City // *Journal of Food Protection.* – 2014. – V. 77. – Issue 12. – P. 21–44.
8. Пилипенко Л.Н., Верхивкер Я.Г., Пилипенко И.В. Консервирование пищевых продуктов. Микробиология, энергетика, контроль. – Одесса: «ВМВ», 2015. – 232 с.
9. de Carvalh C., Caramujo M.-J. Fatty Acids as a Tool to Understand Microbial Diversity and Their Role in Food Webs of Mediterranean Temporary Ponds // *Molecules.* – 2014. – V. 19. – P. 5570–5598.



10. Іваниця В.О., Горшкова О.Г., Коротаєва Н.В., Волювач О.В., Гудзенко Т.В., Остапчук А.М. Склад жирних кислот ліпідів клітин штаму *Bacillus* sp. ОЗ-5, виділеного із забрудненого нафтою ґрунту о. Зміний // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 4 (32). – С. 28–36.
11. Harley J.P., Prescott L.M. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth ed. – N.Y.: The McGraw Hill Companies, 2002. – 466 p.
12. *Microbial ID Inc.* Microbial identification system operational manual. Newark, Delaware: Microbial ID Inc., 1992.
13. Park S.H., Kim H.J., Kim J.H., Kim T.W., Kim H.Y. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR // J Microbial Biotechnol. – 2007. – 17 (7). – P. 1177–1182.
14. Jensen G.B. et al. The genetic basis of aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid // J. Bacteriol. – 1995. – V. 177. – P. 2914–2917.
15. Пилипенко І.В., Пауліна Я.Б., Пилипенко Л.М., Ямборко Г.В. Склад мікробних контамінантів овочевої сировини // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 3 (31). – С. 83–95.
16. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. The Proteobacteric. Part A. // Bergey's Manual Trust Department of Microbiology and Molecular Genetics Michigan State University. – 2005. – 2nd ed., Vol. 2. – P. 317–321.
17. Gilbert R., Turnbull P. C., Parry J. M., Kramer J. M. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: Their part in food poisoning and other clinical infections, in: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification and Identification // Academic Press. – London. – 1981. – P. 207–314.
18. Ash C., Farro, J.A.E., Wallbanks S. & Collins M.D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences // Letters in Applied Microbiology. – 1991. – V. 13. – P. 202–206.
19. Сергєєва Ж.Ю., Іваниця В.О. Плазмідні профілі штамів бактерій-антагоністів роду *Bacillus* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 1 (29). – С. 44–49.

REFERENCES

1. Cleave B. Blackburn. Microbiological spoilage of food products. St. Petersburg: Profession, 2008; 784 p.
2. Galynkin VA, Zaikina NA, Sheveleva SA. Microbiological bases of HACCP in food production. St. Petersburg: Prospect of science, 2007; 350 p.
3. Scallan E, Hoekstra, RM., Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M, Roy, SL et al. Foodborne Illness Acquired in the United States – Major Pathogens. Emerg Infect Dis. 2011; 17(1): P. 7–15.
4. Connor N, Sikorski J, Rooney P et al. Ecology of speciation of the genus *Bacillus*. Appl. Environ. Microbiol. 2010; (76): 1349–1358.
5. Jay JM, Loessner J, Golden DA. Modern Food Microbiology. Moscow: Bionom, 2014; 886 p.



6. Biesta-Peters EG, Dissel S, Reij MW, Zwietering MH, Paul H. Characterization and Exposure Assessment of Emetic *Bacillus cereus* and Cereulide Production in Food Products on the Dutch Market. *Journal of Food Protection*. 2016; 79 (2): 230-238.
7. Flores-Urbá K, Natividad-Bonifaci I, Vázquez-Quiñone C, Vázquez-Sali C, Quiñones-Ramírez E. Detection of Toxigenic *Bacillus cereus* Strains Isolated from Vegetables in Mexico City. *Journal of Food Protection*. 2014; 77(12): 21-44.
8. Pylypenko LN, Verchiver Y G, Pylypenko IV. Preservation of food products. *Microbiology, energy, control*. Odessa: BMV, 2015; 232 p.
9. de Carvalh C, Caramujo M. Fatty Acids as a Tool to Understand Microbial Diversity and Their Role in Food Webs of Mediterranean Temporary Ponds. *Molecules*. 2014; (19): 5570–5598.
10. Ivanytsia VO, Gorshkova OG, Korotaeva NV, Voliuvach OV, Gudzenko TV, Ostapchuk AM. Fatty acid composition of lipids of strain *Bacillus* sp. O3-5 isolated from oilcontaminated soil of the Zmiiny Island. *Microbiology & Biotechnology*. 2015; 4(32): 28-36.
11. Harley JP, Prescott LM. *Laboratory Exercises in Microbiology*, N.Y.:The McGraw Hill Companies. 2002; 466 p.
12. Microbial ID Inc. *Microbial identification system operational manual*. Newark, Delaware: Microbial ID Inc. 1992.
13. Park SH, Kim HJ, Kim JH, Kim TW, Kim HY. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR. *J. Microbial Biotechnol*. 2007; 17 (7):1177 – 1182.
14. Jensen GB et al. The genetic basis of aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid. *J. Bacteriol*. 1995; (177): 2914–2917.
15. Pylypenko IV, Paulina YB, Pylypenko LN, Yamborko GV. Composition of microbial contaminants of vegetable raw material. *Microbiology & Biotechnology*. 2015; 3(31): 83-95.
16. Bergey`s Manual of systematic bacteriology. The Proteobacteric. Part A. In: Bergey`s Manual Trust Department of Microbiology and Molecular Genetics. Michigan State University. 2005; 317-321.
17. Gilbert R, Turnbull PC, Parry JM, Kramer JM. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: Their part in food poisoning and other clinical infections, in: *The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification and Identification*. Academic Press. 1981; 207 – 314.
18. Ash C, Farro, JE, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*. 1991; (13): 202–206.
19. Sergieieva Zh, Ivanytsia V. Plasmid profiles of *Bacillus* genus antagonistic strain. *Microbiology & Biotechnology*. 2015; 1(29): 44-49.

Стаття надійшла до редакції 11.01.2017 р.



УДК 579.264+632.4

О.А. Дрегваль, А.О. Єременко, Н.В. Черевач, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Гагаріна, 72, Дніпро, 49010, тел. +38 (056) 760 85 14,
e-mail microviro@ukr.net

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ГРУНТОВИХ СТРЕПТОМІЦЕТІВ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ТА ГРИБІВ

Мета. Виділення з ґрунту активних ізолятів стрептоміцетів-антагоністів, перспективних для розробки біопрепарату для захисту рослин від збудників грибних та бактеріальних хвороб. **Методи.** Стрептоміцети виділяли із зразків ґрунту на мінеральному середовищі Гаузе. Антагоністичну активність виділених штамів та колекційного штаму стрептоміцету *Streptomyces recifensis* IMB Ac-5018 щодо фітопатогенних бактерій та грибів перевіряли методом дифузії в агар; антифунгальну активність культуральної рідини та супернатанту культуральної рідини визначали за рівнем пригнічення росту фітопатогена на щільному середовищі з метаболітами стептаміцета. Ідентифікацію найактивніших виділених штамів до роду здійснювали за морфологічними та культуральними ознаками. **Результати.** Із 35 проаналізованих штамів ґрунтових мікроорганізмів високий рівень та широкий спектр антагоністичної дії проявили штами *Streptomyces* sp. 31 та *Streptomyces* sp. 35. Штам 35 активно пригнічував ріст фітопатогенних грибів (*Fusarium culmorum* 50716, *Cladosporium herbarum* 16878, *Fusarium moniliforme* 23, *Alternaria alternata* 16, *Aspergillus niger* 25, *F. oxysporum* 12), зони пригнічення росту 15,0–24,5 мм. Штам 31 активно пригнічував ріст фітопатогенних грибів (*Fusarium culmorum* 50716, *Fusarium oxysporum* 54201, *Oidium thackeri* 11, *Alternaria alternata* 16) та фітопатогенних бактерій (*Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* 8254, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 7595, *Xanthomonas campestris* 8003), зони пригнічення росту 14,0–19,5 мм та 15,0–18,7 мм, відповідно. Встановлено пригнічення росту *Fusarium culmorum* 50716 культуральною рідиною та супернатантом культуральної рідини *S. recifensis* IMB Ac-5018, штамів 31 та 35 (76,0–80,2 % та 16,9–24,3%, відповідно). **Висновки.** Досліджені штами можна розглядати як перспективні агенти мікробного препарату для захисту рослин від грибних та бактеріальних хвороб.

Ключові слова: антагоністичні властивості, стрептоміцети, фітопатогенні бактерії, гриби.

Важливу роль у поліпшенні фітосанітарного стану ґрунтів відіграють стрептоміцети – одна з найбільш активних і поширених груп ґрунтових мікроорганізмів, здатних продукувати такі біологічно-активні речовини як вітаміни



групи В, гетероауксини, гібереліни, імуномодулятори, антибіотики, тощо [4]. У рослинництві вторинні метаболіти стрептоміцетів використовують як бактерициди, інсектициди, стимулятори росту рослин, гербіциди, тощо [7]. Так, продуцент авермектину *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179, використовують для отримання вітчизняного препарату аверком, який проявляє високу антипаразитарну та рістстимулювальну активність [2]. Останнім часом науковцями різних країн проводяться дослідження антагоністичних властивостей стрептоміцетів проти збудників хвороб рослин [1, 5, 14–16]. Стрептоміцети вже застосовуються у боротьбі із кілою хрестоцвітих [16], кореневою гниллю та фузаріозом огірків [14], з хворобами томатів [15]. Часто зустрічаються стрептоміцети, що виділяють у навколишнє середовище хітиназу, глюконазу, протеазу, а також літичні ферменти, які руйнують міцелій мікроміцетів, клітини дріжджів і бактерій [3, 12].

На основі продуктів життєдіяльності стрептоміцетів створено антибіотичні препарати, однак широкого використання антибіотики не отримали через їх високу вартість. Перспективнішим є використання живих культур сапрофітних мікроорганізмів. Механізм їх дії на збудників захворювань рослин включає конкуренцію за живлення, ефективну колонізацію ризосфери і листової поверхні, синтез антибіотиків і стимуляторів росту рослин [13]. Враховуючи необхідність екологізації аграрного виробництва, актуальною є розробка ефективних біологічних препаратів для захисту рослин від бактеріальних та грибних хвороб.

Метою даної роботи було виділити з ґрунту активні ізоляти стрептоміцетів-антагоністів, перспективні для розробки біопрепаратів для захисту рослин від збудників бактеріальних та грибних хвороб.

Матеріали та методи досліджень

На наявність антагоністичних властивостей перевірялись 35 штамів стрептоміцетів, виділених із зразків ґрунту степової зони України (Дніпропетровської та Полтавської областей), а також колекційний штам – *Streptomyces recifensis* ІМВ Ас-5018 – продуцент стимулятора росту рослин глікопептидної природи та літичних ферментів (ендопептидаз та глікозидаз), здатних руйнувати клітинні стінки деяких мікроорганізмів [8, 9]. Стрептоміцети виділяли та культивували на мінеральному середовищі Гаузе 7–10 діб за температури 29 °С [10]. Антагоністичну активність щодо фітопатогенних мікроорганізмів перевіряли методом дифузії в агар за діаметром зон затримки росту навколо блоків [6]. Як тест-культури використовували штами фітопатогенних бактерій із колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології (ІМВ) імені Д.К. Заболотного НАН України: *Agrobacterium tumefaciens* 8628, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 102, *Xanthomonas campestris* 80036, *Pectobacterium carotovorum* 8982, *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* 8254, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 7595 та фітопатогенних грибів із колекції відділу фізіології і систематики мікроміцетів ІМВ НАН України *Fusarium oxysporum* 54201, *F. culmorum* 50716, *Cladosporium herbarum* 16878, а також штами із колекції кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ДНУ



АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ҐРУНТОВИХ СТРЕПТОМІЦЕТІВ ...

імені Олесея Гончара, виділені із зразків ґрунту, ураженого насіння та плодів: *F. oxysporum* 12, *F. moniliforme* 23, *Alternaria alternata* 16, *Aspergillus niger* 25, *Oidium thuckeri* 11. Фітопатогенні бактерії вирощували на м'ясо-пептонному агарі, фітопатогенні гриби – на картопляному агарі з 1% глюкози.

Антифунгальну активність культуральних рідин стрептоміцетів визначали методом агарових блоків. Штам *S. recifensis* ІМВ Ас-5018 вирощували в оптимізованому середовищі [8], виділені ізоляти стрептоміцетів – у рідкому мінеральному середовищі Гаузе за температури 27 °С у глибинних умовах на мікробіологічній качалці (220 об/хв) впродовж 3 діб. Культуральну рідину звільняли від міцелію за допомогою стерильного ватного фільтру. Супернатант культуральної рідини отримували центрифугуванням (6000 об/хв, 15 хв) та фільтрували через мембранний фільтр (діаметр пор 0,20 μм). Культуральну рідину або супернатант культуральної рідини вносили у концентрації 5% (від об'єму середовища) у розплавлене та охолоджене до 40 °С середовище Чапека і розливали в чашки Петрі. На поверхню застиглої середовища поміщали блок (діаметром 8 мм) десятидобової культури *F. culmorum* 50716. За контроль слугувало середовище без додавання культуральної рідини. Діаметр колонії вимірювали на 3-тю та 6-ту добу, визначали відсоток пригнічення росту колонії гриба за формулою:

$$(D_k - D_d / D_k) \times 100 \%, \text{ де}$$

D_k – діаметр колонії гриба в мм у контролі, D_d – діаметр колонії гриба в мм у досліді [11].

Ідентифікацію виділених ізолятів до роду проводили за морфологічними та культуральними властивостями за допомогою визначника актиноміцетів [10]. Визначали тип утворення ланцюжків спор, наявність і колір водорозчинних пігментів, колір субстратного і повітряного міцелію на мінеральному агарі Гаузе, органічному агарі 2, вівсяному, та гліцерин-нітратному агарі.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6.

Результати та їх обговорення

Дослідження антагоністичних властивостей виділених штамів та колекційного штаму показало, що до фітопатогенних грибів роду *Fusarium* проявили антагоністичну активність тільки 10 штамів із 36, що складає 28% (табл. 1), до інших грибних тест-культур – 14 штамів – 39%. Найактивнішими проти фітопатогенних грибів виявились ґрунтові штами 11, 31, 35, які пригнічували ріст усіх протестованих мікроміцетів. Серед цих штамів найактивнішим виявився штам 35, який показав 15,0–24,5 мм зони затримки росту шести культур, а саме *F. culmorum* 50716, *C. herbarum* 16878, *F. moniliforme* 23, *F. oxysporum* 12, *A. alternata* 16, *A. niger* 25 та дещо менші (11,3–13,3 мм) зони пригнічення росту інших протестованих штамів мікроміцетів. Спектр активної дії штамів 11 і 31 обмежувався трьома штамами фітопатогенних грибів. Колекційний



Таблиця 1

Антагоністична активність стрептоміцетів до фітопатогенних грибів

Table 1

Antagonistic activity of streptomycetes against phytopathogenic fungi

Штам	<i>Fusarium oxysporum</i> 12	<i>Fusarium oxysporum</i> 54201	<i>Fusarium culmorum</i> 50716	<i>Fusarium moniliforme</i> 23	<i>Alternaria alternata</i> 16	<i>Aspergillus niger</i> 25	<i>Cladosporium herbarum</i> 16878	<i>Oidium Thuckeri</i> 11
<i>Streptomyces</i> sp. 2	0	0	0	0	0	0	0	11,2 ± 0,3 *
<i>Streptomyces</i> sp. 3	0	0	0	0	0	0	10,2 ± 0,2	0
<i>Streptomyces</i> sp. 4	0	0	0	0	0	16,7 ± 2,0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 10	0	0	0	0	0	0	0	12,3 ± 0,4
<i>Streptomyces</i> sp. 11	11,3 ± 0,3	11,3 ± 0,9	15,7 ± 1,3	15,5 ± 1,6	11,7 ± 0,3	17,0 ± 1,5	11,0 ± 0,6	11,7 ± 0,9
<i>Streptomyces</i> sp. 12	0	0	0	0	12,8 ± 0,5	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 14	0	0	11,5 ± 0,5	0	0	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 16	0	0	0	0	11,8 ± 0,3	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 17	0	11,4 ± 0,5	0	0	0	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 18	0	11,5 ± 0,2	0	0	0	0	10,2 ± 0,2	0
<i>Streptomyces</i> sp. 22	0	0	12,5 ± 0,5	0	12,5 ± 0,5	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 25	0	10,2 ± 0,3	0	0	0	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 31	13,0 ± 2,0	14,0 ± 2,0	15,8 ± 1,0	13,3 ± 1,8	19,5 ± 1,5	13,0 ± 0,5	11,5 ± 0,6	16,0 ± 1,5
<i>S. recifensis</i> IMB Ac-5018	0	0	13,0 ± 1,5	0	15,0 ± 2,0	0	13,7 ± 1,7	13,7 ± 0,7
<i>Streptomyces</i> sp. 35	15,3 ± 1,8	11,3 ± 0,9	19,8 ± 1,2	15,0 ± 1,1	20,0 ± 2,0	24,5 ± 1,8	17,0 ± 1,2	13,3 ± 0,9
<i>Streptomyces</i> sp. 36	9,6 ± 0,2	0	10,5 ± 0,5	0	13,9 ± 0,6	0	10,0 ± 0,3	11,5 ± 0,5

Примітки: * – діаметр зони пригнічення росту, мм

«0» – відсутність зони пригнічення росту

Notes: * – diameter of growth inhibition zone, mm

«0»- absence of growth inhibition zone



АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ҐРУНТОВИХ СТРЕПТОМІЦЕТІВ ...

штам *S. recifensis* ІМВ Ас-5018, порівняно із ґрунтовими штамми виявився менш активним, значною мірою пригнічував ріст *A. alternata* 16, до трьох тест культур (*F. culmorum* 50716, *C. herbarum* 16878, *Oidium thuckeri* 11) показав помірний антагонізм (зони 13,0–13,7 мм), ріст інших штамів *Fusarium* та *A. niger* 25 не пригнічував.

Із протестованих фітопатогенних грибів найчутливішими до дії досліджуваних штамів виявилися *C. herbarum* 16878 та *A. alternata* 16 (їхній ріст пригнічували 8 ізолятів), найстійкішими – виділені штамми із зразків кукурудзи та ґрунту, відповідно, *F. moniliforme* 23 та *F. oxysporum* 12 (ріст пригнічувався лише штамми 3 та 4, відповідно).

Із досліджених культур грибів роду *Fusarium* найчутливішим до антагоністичної дії виділених штамів виявився штам *F. culmorum* 50716. Його ріст пригнічували 7 перевірених штамів.

Найстійкішим до дії антагоністів серед досліджених штамів мікроміцетів, що не відносяться до роду *Fusarium* був нововиділений штам *A. niger* 25, його ріст пригнічували лише 4 культури.

Після першого етапу скринінгу виділених мікроорганізмів було доцільним дослідити антифунгальну активність найактивніших штамів 31, 35 та штаму *S. recifensis* ІМВ Ас-5018, вирощених у глибинних умовах. Перевіряли антифунгальну активність звільненої від міцелію культуральної рідини та супернатанту культуральної рідини. Як тест-об'єкт використовували штам *F. culmorum* 50716 (рис. 1).

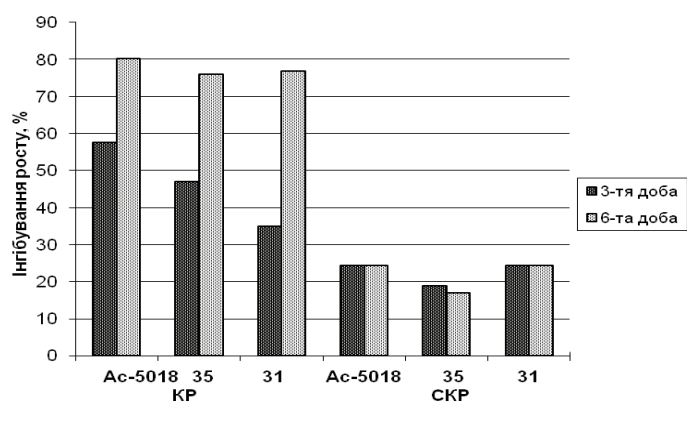


Рис. 1. Пригнічення росту *F. culmorum* 50716 штамми *Streptomyces recifensis* ІМВ Ас-5018 та штамми 31 та 35

Примітка: КР – культуральна рідина, СКР – супернатант культуральної рідини

Fig. 1. Inhibition of the growth of *F. culmorum* 50716 by collection strain of *Streptomyces recifensis* IMB Ac-5018 and isolates 31 and 35

Note: CL (КР) – cultural liquid, SCL (СКР) – supernatant of cultural liquid



Як видно з наведених даних, супернатант культуральної рідини усіх стрептоміцетів меншою мірою гальмував ріст гриба, ніж культуральна рідина. Вірогідно, антифунгальний ефект культуральної рідини пов'язаний із проростанням спор стрептоміцетів та з додатковою продукцією екзоферментів та антибіотичних речовин.

Усі ґрунтові штами та штам *S. recifensis* ІМВ Ас-5018 були досліджені на наявність антагоністичних властивостей щодо фітопатогенних бактерій (табл. 2). Встановлено, що до бактеріальних фітопатогенів антагоністична активність стрептоміцетів проявилася набагато слабше, ніж до грибних. Із 36 штамів лише чотири (11, 23, 31, 36) характеризувалися широким спектром антагоністичної дії, пригнічували ріст 5 із 6 тест-культур. Високу активність виявлено у штаму 31 відносно двох штамів *P. syringae* (зони відсутності росту 17,5 та 18,7 мм) і штаму *X. campestris* (15 мм) та у штаму 23, який затримував ріст *C. michiganensis* та *P. syringae* pv. *atrofaciens* (17,5 та 17,0 мм, відповідно).

Аналіз взаємовідносин стрептоміцетів із фітопатогенними бактеріями показав, що найбільший антагонізм виділені стрептоміцети проявляли до бактерій роду *Pseudomonas*.

Таким чином, із 36 досліджуваних штамів 11, 31 та 36 проявили антагоністичні властивості як до бактеріальних, так і грибних фітопатогенів. Штам *S. recifensis* ІМВ Ас-5018 та штам 35 показали високу антагоністичну активність відносно фітопатогенних грибів, а штам 23 – до деяких фітопатогенних бактерій. Штами 31 та 35 мають широкий спектр антагоністичної дії та високий рівень активності і є перспективними для подальшої роботи. Штами 11 та № 36 мають широкий спектр дії, але невисоку активність і потребують проведення селекції. Що стосується колекційного штаму *S. recifensis* ІМВ Ас-5018, то за спектром антифунгальної дії він поступався виділеним штамам, антибактеріальна активність цього штаму була відсутня, або була слабкою.

У ході досліджень проведено ідентифікацію до роду найактивніших штамів 31 та 35 за морфологічними та культуральними ознаками.

Штам 31 мав розташовані у мутовках короткі або довгі прямі, злегка хвилясті та короткі у вигляді гачків ланцюжки спор. На мінеральному агарі Гаузе утворював кремово-білий, подекуди жовтуватий повітряний міцелій, світло-жовтий водорозчинний пігмент та жовтогарячий субстратний міцелій, на вівсяному агарі утворював білий із блідо-помаранчевими краплями повітряний міцелій, помаранчево-червоний субстратний міцелій та не утворював водорозчинний пігмент; на гліцерин-нітратному агарі – кремовий, подекуди лимонний повітряний міцелій, помаранчево-жовтий субстратний міцелій і також не утворював водорозчинний пігмент. На органічному агарі 2 повітряний міцелій ріс слабо, був кремово-білого, подекуди лимонного кольору, субстратний міцелій був жовтувато-бурий, блідий, а водорозчинний пігмент – жовтувато-бурий.

Штам 35 мав короткі та довгі ланцюжки спор у вигляді петель, гачків, спіралей. На мінеральному агарі Гаузе утворював рожево-кремовий, подекуди сірий повітряний міцелій та жовтувато-оливковий, сіруватий субстратний міце-



Table 2

Антагоністична активність стрептоміцетів до фітопатогенних бактерій

Antagonistic activity of streptomycetes against phytopathogenic bacteria

Штам	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 8628	<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>michiganensis</i> 102	<i>Xanthomonas campestris</i> 8003	<i>Pectobacterium carotovorum</i> 8982	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atropaciens</i> 8254	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 7595
<i>Streptomyces</i> sp. 1	11,0 ± 0,3 *	0	0	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 7	0	0	0	0	10,0 ± 0,2	10,0 ± 0,2
<i>Streptomyces</i> sp. 11	9,5 ± 0,5	11,3 ± 0,9	12,3 ± 0,9	10,5 ± 0,5	0	12,5 ± 0,3
<i>Streptomyces</i> sp. 14	0	0	9,8 ± 0,3	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 15	0	10,0 ± 0,3	0	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 16	0	0	0	11,0 ± 0,3	10,0 ± 0,2	0
<i>Streptomyces</i> sp. 18	0	11,2 ± 0,4	0	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 20	0	10,8 ± 0,7	0	0	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 22	0	0	0	11,0 ± 0,5	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. 23	10,5 ± 0,3	17,5 ± 1,3	10,5 ± 0,5	0	17,0 ± 1,0	10,0 ± 0,2
<i>Streptomyces</i> sp. 31	10,2 ± 0,2	0	15,0 ± 1,5	9,5 ± 0,5	17,5 ± 1,2	18,7 ± 1,1
<i>Streptomyces</i> sp. 32	9,9 ± 0,3	0	0	0	0	0
<i>S. recifensis</i> IMB Ac-5018 (33)	0	0	0	0	9,5 ± 0,5	0
<i>Streptomyces</i> sp. 35	10,0 ± 0,2	0	12,5 ± 1,5	0	9,5 ± 0,3	9,6 ± 0,4
<i>Streptomyces</i> sp. 36	0	11,3 ± 0,8	12,0 ± 1,2	11,0 ± 0,9	13,0 ± 0,3	15,0 ± 0,5

Примітки: * – діаметр зони пригнічення росту, мм

«0» – відсутність зони пригнічення росту

Notes: * – diameter of growth inhibition zone, mm

«0»-absence of growth inhibition zone

лій. На вівсяному агарі утворював блідо-рожевий, подекуди білий повітряний міцелій, оливковий, майже безбарвний субстратний міцелій та блідо-оливковий, зеленуватий водорозчинний пігмент; на гліцерин-нітратному агарі – блідо-рожево-білий, кремово-білий повітряний міцелій, жовтувато-оливковий майже безбарвний субстратний міцелій та буроватий водорозчинний пігмент; на органічному агарі 2 слабо утворював блідо-рожево-білий повітряний міцелій, жовтувато-бурий майже безбарвний субстратний міцелій та не утворював водорозчинний пігмент. За цими ознаками штами 31 та 35 віднесено до роду *Streptomyces*.

Останнім часом стрептоміцети привертають до себе увагу не тільки як продуценти антибіотиків, але і як продуценти речовин, що пригнічують ріст та розвиток фітопатогенних бактерій і грибів. Наразі стоїть проблема пошуку продуцентів антибіотиків, які не використовуються в медицині. Так, О. Громико із ризосфери чистотілу виділив ізоляти стрептоміцетів, високоактивні тільки проти дріжджів і фітопатогенних бактерій [5]. Л.О. Білявська і співавтори повідомили про високу антагоністичну активність *Streptomyces netropsis* IMB Ac-5025 до широкого спектру фітопатогенних бактерій та грибів. Найактивніше цей штам пригнічує ріст *A. alternate* 16814 та деяких представників фітопатогенних бактерій, які відносяться до родів *Pseudomonas* і *Xanthomonas* [1]. Отримані нами результати узгоджуються з даними цих авторів, адже виділені ізоляти стрептоміцетів також найактивніше пригнічують ріст саме цих фітопатогенів.

Таким чином, слід зазначити, що виділені штами *Streptomyces sp.* 31 та *Streptomyces sp.* 35 можна розглядати як перспективні агенти для розробки мікробного препарату для захисту рослин від грибних та бактеріальних хвороб. Колекційний штам *S. recifensis* IMB Ac-5018, який є продуцентом стимулятора росту рослин глікопептидної природи [2], також виявив антифунгальну активність.

Висловлюємо подяку директору IMB імені Д.К. Заболотного академіку НАН України В.С. Підгорському, академіку НААН України В.П. Патиці та д.б.н. І.М. Курченко за надання культур фітопатогенних бактерій та грибів.

УДК 579.264+632.4

О.А. Dreghval, A.O. Yeremenko, N.V. Cherevach, A.I. Vinnikov

Dnipropetrovsk National University named after Oles Honchar,
72, Gagarina Pr., Dnipro, 49010, tel.: +38 (056) 760 85 14
e-mail: microviro@ukr.net

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF SOIL STREPTOMYCETES AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA AND FUNGI

Summary

Aim. The selection of soil active cultures of *Streptomyces* antagonists promising for the development of a biopreparation for plant protection against pathogens of fungal and



bacterial diseases. **Methods.** *Streptomyces* were isolated from the samples of soil on mineral medium Gause. The antagonistic activity of the selected isolates and collection strain of *Streptomyces recifensis* IMV Ac-5018 against phytopathogenic bacteria and fungi was tested by agar diffusion method; the antifungal activity of cultural liquid and supernatant of cultural liquid was determined by agar blocks method. The identification of the most active selected isolates to genus level was carried out by taking into consideration the morphological and cultural characteristics. **Results.** From 35 isolates of soil microorganisms the isolates №31 and №35 belonging to the genus *Streptomyces* showed high level and wide range of antagonistic action. Isolate №35 actively inhibited the growth of phytopathogenic fungi (*Fusarium culmorum* 50716, *Cladosporium herbarum* 16878, *Fusarium moniliforme* 23, *Alternaria alternata* 16, *Aspergillus niger* 25, *F. oxysporum* 12), the zones of growth inhibition were 15.0–24.5 mm. Isolate №31 actively inhibited the growth of phytopathogenic fungi (*Fusarium culmorum* 50716, *Fusarium oxysporum* 54201, *Oidium thuckeri* 11, *Alternaria alternata* 16) and phytopathogenic bacteria (*Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 8254, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 7595, *Xanthomonas campestris* 8003), the zones of growth inhibition were 14.0–19.5 mm and 15.0–18.7 mm, respectively. The cultural liquid and supernatant of cultural liquid of *S. recifensis* IMV-Ac 5018, the isolates №31 and №35 inhibited growth of *Fusarium culmorum* 50716 (76.0–80.2% and 16.9–24.3%, respectively). **Conclusions.** The selected isolates can be regarded as promising microbial agents of biopreparation to protect the plants against fungal and bacterial diseases. The collection strain *S. recifensis* IMV Ac-5018 is a producer of glycopeptic plant growth stimulator; it also showed antifungal activity, allowing to use it in plant protection against diseases.

Key words: antagonistic properties, *Streptomyces*, phytopathogenic bacteria and fungi.

УДК 579.264+632.4

А.А. Дрегваль, А.А. Еременко, Н.В. Черевач, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара,
пр. Гагарина, 72, г. Днепр, 49010, тел. +38 (056) 760 85 14,
e-mail microviro@ukr.net

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ СТРЕПТОМИЦЕТОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ФИТОПАТОГЕННЫМ БАКТЕРИЯМ И ГРИБАМ

Реферат

Цель. Выделение из почвы активных культур стрептомицетов-антагонистов, перспективных для разработки биопрепарата для защиты растений от возбудителей грибных и бактериальных болезней. **Методы.** Стрептомицеты выделяли из образцов почвы на минеральной среде Гаузе. Антагонистическую активность выделенных штаммов и коллекционного штамма стрептомицета *Streptomyces recifensis* IMV Ac-5018 относительно фитопатогенных бактерий и грибов определяли методом диффузии в агар; антифунгальную активность культуральной жидкости и супернатанта культуральной жидкости определяли



по уровню угнетения роста фитопатогена на плотной среде с метаболитами стрептомицета. Идентификацию самых активных выделенных штаммов до рода осуществляли по морфологическим и культуральным признакам. **Результаты.** Из 35 проанализированных штаммов почвенных микроорганизмов высокий уровень и широкий спектр антагонистического действия проявили штаммы 31 и 35, отнесенные к роду *Streptomyces*. Штамм 35 активно угнетал рост фитопатогенных грибов (*Fusarium culmorum* 50716, *Cladosporium herbarum* 16878, *Fusarium moniliforme* 23, *Alternaria alternata* 16, *Aspergillus niger* 25, *F. oxysporum* 12), зоны подавления роста 15,0–24,5 мм. Штамм 31 активно подавлял рост фитопатогенных грибов (*Fusarium culmorum* 50716, *Fusarium oxysporum* 54201, *Oidium thuckeri* 11, *Alternaria alternata* 16) и фитопатогенных бактерий (*Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* 8254, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 7595, *Xanthomonas campestris* 8003), зоны подавления роста 14,0–19,5 мм и 15,0–18,7 мм, соответственно. Установлено ингибирование роста *Fusarium culmorum* 50716 культуральной жидкостью и супернатантом культуральной жидкости *S. recifensis* ИМВ Ас-5018, штаммов 31 и 35 (76,0–80,2% и 16,9–24,3%, соответственно). **Выводы.** Выделенные штаммы можно рассматривать как перспективные агенты микробного препарата для защиты растений от грибных и бактериальных болезней растений.

Ключевые слова: антагонистические свойства, стрептомицеты, фитопатогенные бактерии, грибы.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Белявская Л. А., Ефименко Т. А., Ефременкова О. В., Козырицкая В. Е., Иутинская Г. А. Идентификация и антагонистические свойства почвенного стрептомицета *Streptomyces* sp. 100 // Микробиол. журн. – 2016. – Т. 78, № 2. – С. 61–73.
2. Биорегуляция микробно-растительных систем: Монография / Иутинская Г.А., Пономаренко С.П., Андреюк Е.И. и др.; Под общей ред. Г.А. Иутинской, С.П. Пономаренко. – К.: Ничлава, 2010. – 464 с.
3. Болорма Ч, Абдул Ахмад Н, Кадырова Г.Д. Биоразнообразие актиномицетов рода *Streptomyces*, выделенных из почв Республики Татарстан, и их ферментативная активность // Учёные записки Казанского ун-та. – 2013. – Т. 155, кн. 1. – С. 148–157.
4. Валагурова Е. В., Козырицкая В. Е., Иутинская Г. А. Актиномицеты рода *Streptomyces*: описание видов и компьютерная программа их идентификации. – К.: Наукова думка, 2003. – 645 с.
5. Громико О. Антагоністичні властивості актиномицетів, виділених із ризосфери чистотілу великого *Chelidonium majus* L. // Вісник Львівського університету: Серія біологічна. – 2014. – № 64.– С. 279–286.
6. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп.– М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. – 528 с.
7. Еришов Ю. В. 2-С-метилэритритфосфатный путь биосинтеза изопреноидов как мишень при поиске новых антибиотиков, гербицидов и иммуномодуляторов // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 2. – С. 133–154.



8. Жерносекова И. В., Черногор Н. П., Тымчук А. А., Винников А. И. Методы планирования экспериментов при оптимизации питательной среды для стрептомицета // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2010. – Вип. 18., т.1. – С. 20–28.
9. Жерносекова И.В., Тымчук О.А., Ткаченко В.А. П., Винников А.И. Вплив продуктів метаболізму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* на ріст проростків овочевих культур // Мікробіологія і біотехнологія. – 2014. – № 1 (25). – С. 79–90.
10. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. – М.: Наука, 1983. – 248 с.
11. Смирнов О.В., Гришечкина С.Д. Изучение действия биопрепаратов на основе *Bacillus thuringiensis* на фитопатогенные грибы// Вестник защиты растений. – 2010. – №1. – С. 27–35.
12. Abd-Allah E.F. *Streptomyces plicatus* as a model biocontrol agent // Folia Microbiol (Praga). – 2002. – Vol. 44, N 4. – P. 309–314.
13. Doumbou C.L., Hamby Salove M.K., Crawford D.L., Beaulieu C. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth// Phytprotection. – 2002. – V. 82, № 3. – P. 85–102.
14. Sharifi F., Farrokhi P.R., Sh. Bonjar G.H. Biological control of *Pythium aphanidermatum*, the causal agent of damping off disease of greenhouse cucurbits in Kerman Province of Iran // Res. J. Biological Sci. – 2007. – Vol. 2, N 2. – P. 188–191.
15. Dhanasekaran D., Sivamani P., Panneerselvam A., Thajuddin N., Rajakumar G., Selvamani S. Biological control of tomato seedling damping off with *Streptomyces* sp. // Plant Pathol. J. – 2005. – Vol. 4, № 2. – P. 91–95.
16. Cheah L.-H., Kent G., Gowers S. Brassica crops and a *Streptomyces* sp. as potential biocontrol for clubroot of brassicas // New Zealand Plant Protection. – 2001. – Vol. 54. – P. 80–83.

REFERENCES

1. Belyavskaya LA, Efimenko TA, Efremenkova OV, Kozyrinskaya VE, Iutynska GA. Identification and antagonistic properties of the soil streptomycete *Streptomyces* sp. 100. Mikrobiologichny zhurnal. 2016; 78 (2): 61–73.
2. Bioregulation of microbial-plant systems. Eds. Iutynska GO, Ponomarenko SP. Kyiv: Nichlava, 2010. 472 p.
3. Bolorma Ch, Abdul Ahmad N, Kadyirova GD, Pankova AV, Evtyugin VG, Alimova FK. Biodiversity of actinomycetes of the genus *Streptomyces* isolated from soil in the republic of Tatarstan and their enzyme activity. Uchyonyie zapiski Kazanskogo universiteta. 2013; 155 (1): 148–157.
4. Valagurova EV, Kozyrinskaya VE, Iutinskaya GA. Actinomycetes of *Streptomyces* genus. Description of species and computer program of their identification. Keiv: Naukova dumka, 2003. 645 p.
5. Hromyko O. Antagonistic properties of actinomycetes isolated from the rhizosphere *Chelidone chelidonium majus* L. Visnyk Lvivskogo universytetu. Seriya byolohychna. 2014; (64): 279–286.



6. Egorov NS. Fundamentals of the doctrine of antibiotics: Textbook. 6th ed., Revised and supplemented. Moskva: Nauka. 2004. 528 p.
7. Ershov YuV. 2-C-methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis as a target in the search for new antibiotics, herbicides and immunomodulators. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2007; 43 (2): 133–154.
8. Zhernosekova IV, Chernogor NP, Tymchuk AA, Vinnikov AI. Methods of experiment planning for optimizing the nutrient medium for streptomycetes. *Visnyk Dnipropetrovskogo universytetu. Biologiya. Ekologiya*. 2010; 18 (1): 20–28.
9. Zhernosekova IV, Tymchuk OA, Tkachenko VP, Vinnikov AI. Effect of metabolic products of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* on the vegetables sprouts growth. *Mikrobiologiya i biotekhnologiya*. 2014; 1 (25): 79 – 90.
10. Gauze GF, Preobrazhenskaya TP, Sveshnikova MA, Terehova LP, Maksimova TS. The determinant of actinomycetes. Moskva: Nauka. 1983. 248 p.
11. Smirnov OV, Grischeckina SD. Study antifungal activity *Bacillus thuringensis* preparations. *Vestnik zashchity rasteniy*. 2010; (1): 27–35.
12. Abd-Allah EF. *Streptomyces plicatus* as a model biocontrol agent. *Folia Microbiol (Praga)*. 2002; 44 (4): 309–314.
13. Doumbou CL, Hamby Salove MK, Crawford DL, Beaulieu C. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*. 2002; 82 (3): 85–102.
14. Sharifi F, Farrokhi PR, Sh. Bonjar GH. Biological control of *Pythium aphanidermatum*, the causal agent of damping off disease of greenhouse cucurbits in Kerman Province of Iran. *Res. J. Biological Sci*. 2007; 2 (2): 188–191.
15. Dhanasekaran D, Sivamani P, Panneerselvam A, Thajuddin N, Rajakumar G, Selvamani S. Biological control of tomato seedling damping off with *Streptomyces* sp. *Plant Pathol. J*. 2005; 4 (2): 91–95.
16. Cheah LH, Kent G, Gowers S. Brassica crops and a *Streptomyces* sp. as potential biocontrol for clubroot of brassicas. *New Zealand Plant Protection*. 2001; (54): 80–83.

Стаття надійшла до редакції 22.10.2016 р.



К.Д. Крилова, Ж.Ю. Сергєєва, О.В. БасюлОдеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна, тел.:+38 (048) 68 79 64, e-mail: k.d.krylova@gmail.com

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ДО ЗБУДНИКА М'ЯКОЇ ГНИЛІ КОМПЛЕКСУ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ І КАРОТОВОРИЦИНІВ ЗА ЗБЕРІГАННЯ

Мета роботи. Визначити залежність активності комплексу каротоворицинів *Erwinia carotovora* ОНУ320 та бактерій *Lactobacillus plantarum* ОНУ87, якому властива антимікробна дія до фітопатогенних ервіній, від температури та терміну зберігання. **Матеріали і методи.** До складу комплексу входять каротоворицини (дефектні фагові частки) штаму *E. carotovora* ОНУ320, одержані шляхом спонтанної індукції, та бактерії *L. plantarum* ОНУ87 (титр 10^5 КУО/мл) у співвідношенні 1:1. Комплекс каротоворицинів і лактобацил та його окремі компоненти зберігали впродовж 31 доби за температури 20; 4; -20 °С. Кілерну активність каротоворицину визначали за розміром зон лізису на газоні індикаторного штаму ервіній. Життєздатність лактобактерій *L. plantarum* ОНУ87 визначали за зміною чисельності шляхом культивування на цільному середовищі MRS. **Результати.** Встановлено, що максимальна життєздатність клітин *L. plantarum* ОНУ87 зберігається за температури -20 °С при додаванні гліцерину порівняно до цього ж показника за температури 4 та 20 °С. Показано, що присутність лактобактерій *L. plantarum* ОНУ87 негативно впливає на активність каротоворицинів при зберіганні у суміші за температури 4 та 20 °С. **Висновки.** Зниження активності каротоворицину за температури 4 та 20 °С у присутності лактобактерій, ймовірно, відбувається за рахунок дестабілізації білків, які утворюють дефектні фагові відростки, та самовільного скорочення фагових хвостових відростків під час зберігання.

Ключові слова: зберігання, фітопатогени, бактеріоцин, *Erwinia carotovora*, *Lactobacillus plantarum*

В останні роки все більше поширюється застосування бактеріофагів для лікування різноманітних інфекційних хвороб людини, тварин та в захисті рослин [1, 2]. Додавання до складу біопрепарату бактеріоцинів фагової природи на рівні з повноцінними фаговими частками може розширити коло кілерної активності та підвищити його захисний ефект [3].

За рахунок дефектної полілізогенії у фітопатогенної бактерії *Erwinia carotovora* утворюється значна кількість дефектних фагових часток, зокрема хвостових відростків [4]. Дефектні фагові частки, названі макромолекулярними каротоворицинами, характеризуються широким спектром антибактеріальної активності до споріднених бактерій [5].



Останнім часом все більше з'являються повідомлення про ефективність застосування лактобактерій для захисту рослин від фітопатогенних бактерій [6, 13]. Окрім антагоністичного впливу на патогени для лактобацил показано і стимулювальний вплив щодо рослини-хозяїна, що відкриває нові перспективи для їх використання у складі біопрепаратів для рослинництва [7].

В попередніх дослідженнях було показано ефективність захисного впливу сумісного застосування *Lactobacillus plantarum* ОНУ87 та каротоворицинів бактерій штаму *Erwinia carotovora* ОНУ320 від ураження коренеплодів та бульб картоплі збудником м'якої гнилі [6, 7, 12]. За довготривалого зберігання кароворицинів спостерігалось зниження їх кілерної активності [8]. Бактерії штаму *L. plantarum* ОНУ87, за попередніми даними, при зберіганні за температури 4 °С залишаються життєздатними впродовж 2 місяців [12]. Отже, дві складові захисного комплексу можуть як вимагати різних умов зберігання, так і зменшувати антимікробну активність.

Метою дослідження було визначити залежність активності комплексу каротоворицинів *Erwinia carotovora* ОНУ320 та бактерій *Lactobacillus plantarum* ОНУ87, який характеризується антимікробною дією відносно фітопатогенних ервіній, від температури та терміну зберігання.

Матеріали і методи

Захисний комплекс складається з каротоворицинів штаму *E. carotovora* ОНУ320 та бактеріальних клітин *L. plantarum* ОНУ87 у рівних об'ємах. Каротоворицини *E. carotovora* ZM1 одержували шляхом спонтанної індукції на оптимізованому середовищі А3 [6]. Лактобактерії *L. plantarum* ОНУ87 вирощували у бульоні MRS за температури 37 °С протягом 24 годин до одержання титру 10^{10} КУО/мл [6, 9].

Захисний комплекс і його окремі компоненти витримували протягом 31 доби за температури 20, 4 та -20 °С. Контроль стабільності окремих компонентів і їх суміші проводили впродовж 31 доби зберігання. Стабільність каротоворицинів *E. carotovora* ОНУ320 як окремого компоненту, так і у суміші з лактобактеріями визначали за показником кілерної активності до штама-індикатора *E. carotovora* ОНУ319 [6]. Концентрацію бактерій штаму *L. plantarum* ОНУ87 визначали шляхом посіву на щільне середовище MRS. Для збереження життєздатності лактобацил за температури -20 °С у криопробірці з одним мл захисної суміші вносили 250 мкл гліцерину [10].

Статистичне опрацювання результатів здійснювали загальноприйнятими методами варіаційного та кореляційного аналізу з застосуванням програми Microsoft Excel 2010. Вірогідність відмінностей отриманих результатів оцінювали на рівні значимості не менше 95%.

Результати та їх обговорення

У ході проведених досліджень встановлено, що активність бактеріоцину знижується на 14 добу лише за умови зберігання за температури 20 °С, але не втрачається повністю навіть на 30 добу експерименту (табл. 1).



Активність каротоворицинів *E. carotovora* ОНУ320 за різних строків і температури зберігання

Table 1

E. carotovora ОНУ320 carotovoricines activity under different terms and conditions of storage

Доба	Активність каротоворицину					
	Каротоворицин та лактобактерії			Каротоворицин		
	20 °С	4 °С	-20 °С	20 °С	4 °С	-20 °С
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+	+
5	-	+	+	+	+	+
7	-	+	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+	+
14	-	+/-	+	+/-	+	+
21	-	+/-	+	+/-	+	+
30	-	+/-	+	+/-	+	+

Примітка: «+» – наявність кілерної активності, «+/-» – зменшення прозорості та/або розміру зон лізису, «-» – відсутність кілерної активності

Note: «+» – availability of killer activity, «+/-» – decrease of transparence and/or size of lysis zones, «-» – absence of killer activity

Активність каротоворицину не зникає навіть при -20 °С у замерзлому середовищі без гліцерину. Водночас показано, що додавання гліцерину перед заморожуванням до каротоворицину також не впливає на його активність (рис. 1Г-5).

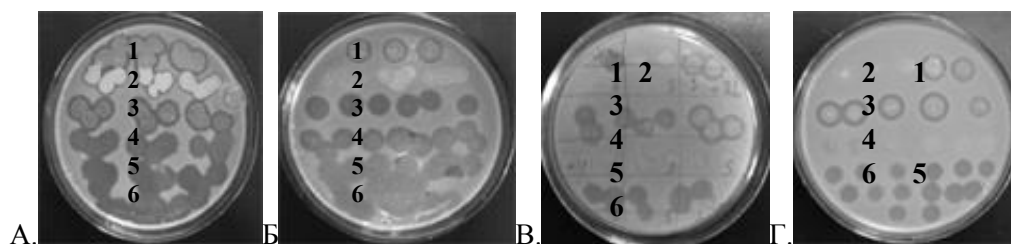


Рис. 1. Кілерна активність каротоворицину на першу (А), третю (Б), чотирнадцяту (В) і тридцяту (Г) добу зберігання: при 20 °С каротоворицин (1), суміш (2); при 4 °С каротоворицин (3), суміш (4); при -20 °С каротоворицин (5), суміш (6)

Fig. 1. Carovoricines killer activity on the first (A), third (Б), fourteenth (В) and thirtieth (Г) preservation day: at 20 °С carovoricene (1), mixture (2); at 4 °С carovoricene (3), mixture (4); at -20 °С carovoricene (5), mixture (6)

При зберіганні за температури 20 °С і 4 °С чисельність лактобацил незначно повільно зростає впродовж перших 3 діб (рис. 2). За -20 °С чисельність лактобацил впродовж 5 діб не зменшувалася і в подальшому життєздатність клітин у цих зразках залишилася на високому рівні. Зафіксоване зростання титру за 20 °С і 4 °С можна пояснити тим, що штам *L. plantarum* ОНУ87 є природним ізолятом, і фізіологічно адаптований до росту в широкому діапазоні температур [13].

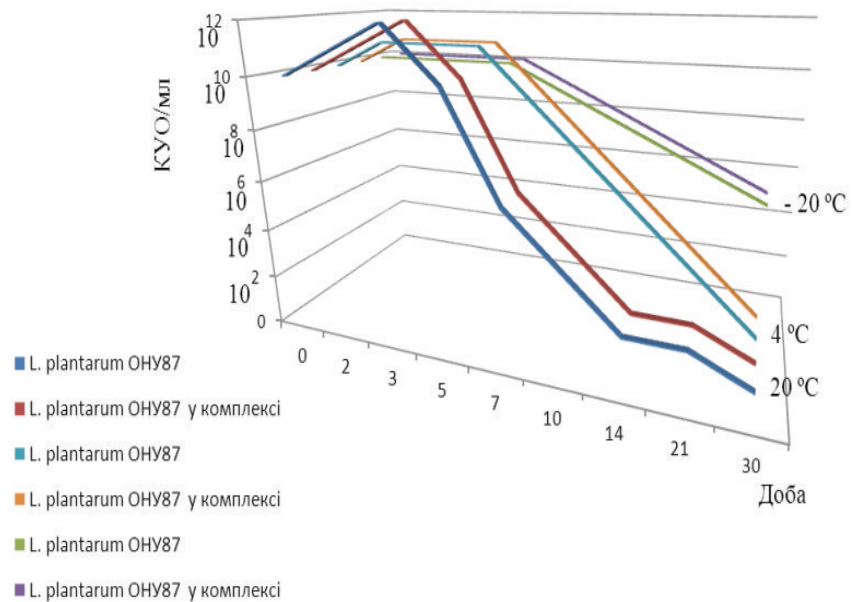


Рис. 2. Життєздатність *L. plantarum* ОНУ87 при зберіганні

Fig. 2. *L. plantarum* ONU 87 viability during preservation

Більш повільне зниження титру *L. plantarum* ОНУ87 під час зберігання за температури 4 °С, порівняно з цим показником за температури 20 °С, можна пояснити зниженням метаболічних процесів у клітинах бактерій, що проявляється також в більш повільному накопиченні метаболітів. Починаючи з 5-ої до 30-ої доби, за усіх температур зберігання, показано поступове зменшення титру бактерій *L. plantarum* ОНУ87 з 10⁹ КУО/мл до 10¹ КУО/мл (рис. 2, 3).

У випадку зберігання комплексу за різних температур графік чисельності лактобактерій змінюється з такою ж закономірністю, як і без каротоворицинового компоненту (рис. 2).

Щодо активності каротоворицину у складі комплексу, то після першого тижня зберігання при температурі 4 і -20 °С змін відмічено не було. Зберігання суміші при 20 °С призвело до повного зникнення активності макромолекулярного каротоворицину вже після третьої доби. При цьому можна відмітити, що

у бактеріоцину, який зберігався окремо в аналогічних умовах активність, не знизилася (рис. 1, табл. 1).

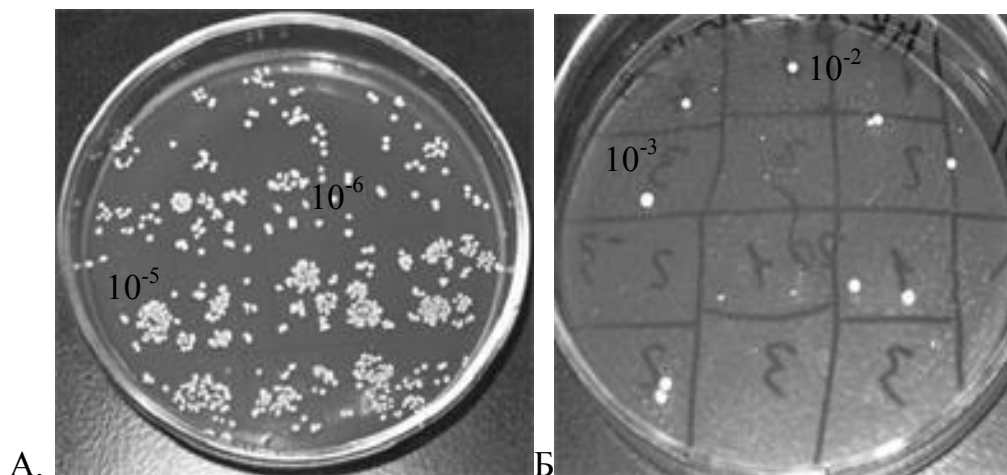


Рис. 3. Колонії *L. plantarum* ОНУ87 на середовищі MRS при зберіганні у складі комплексу з каротоворицинами за температури -20°C на початку експерименту(А) і на 30 добу (Б)

Fig. 3. Colonies of *L. plantarum* ОНУ87 on MRS medium in complex with carotovoricines at -20°C on the beginning (А) and the 30 day of the experiment (Б)

Через 14 діб зберігання за температури 4°C відмічено зменшення активності каротоворицину у суміші з *L. plantarum* ОНУ87. Через 30 діб після початку дослідження вихідна активність каротоворицину (прозорість та розмір зон лізису) у складі захисної суміші на газоні чутливої культури спостерігалась лише у зразках, які зберігались за температури -22°C (рис. 1).

Таким чином, каротоворицин *E. carotovora* ОНУ320 у комплексі з бактеріями штаму *L. plantarum* ОНУ87 зберігає антимікробну активність проти збудника м'якої гнилі за температури 20°C не більше двох діб, при 4°C – до 14 діб, а за -22°C – впродовж усього терміну дослідження. Зниження активності каротоворицину за температури 4 та 20°C у присутності лактобактерій, ймовірно, відбувається за рахунок дестабілізації білків, які утворюють дефектні фагові відростки, та самовільного скорочення цих відростків [7, 11]. Таким чином, наявність молочнокислих бактерій та їх метаболітів у середовищі дестабілізує каротоворициновий компонент та знижує його активність у захисній суміші при зберіганні за температури 4 і 20°C , що проявляється як зменшення діаметру і прозорості зон лізису на газоні індикаторної бактерії [7].

Е.Д. Крылова, Ж.Ю. Сергеева, Е.В. Басюл

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, тел. 8 (048) 68 79 64, e-mail: k.d.krylova@gmail.com

АНТИМИРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЯГКОЙ ГНИЛИ КОМПЛЕКСА МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРИЙ И КАРОТОВОРИЦИНОВ ПРИ ХРАНЕНИИ

Реферат

Цель работы. Определить зависимость активности комплекса каротоворицинов *Erwinia carotovora* ОНУ320 и бактерий *Lactobacillus plantarum* ОНУ87, который характеризуется противомикробным действием в отношении фитопатогенных эрвиний, от температуры и срока хранения. **Материалы и методы.** В состав комплекса входят каротоворицины (дефектные фаговые частицы) штамма *E. carotovora* ОНУ320, полученные путем спонтанной индукции, и бактерий *L. plantarum* ОНУ87 (титр клеток 10^5 КОЕ / мл) в соотношении 1:1. Комплекс каротоворицинов и лактобацилл и каждый его отдельный хранили в течение 31 суток при температуре -20, 4 и 20 °С. Киллерную активность каротоворицинов определяли по размеру зон лизиса на газоне индикаторного штамма эрвиний. Жизнеспособность лактобактерий *L. plantarum* ОНУ87 определяли по изменению численности путем культивирования на плотной питательной среде MRS.. **Результаты.** Установлено, что максимальная жизнеспособность клеток *L. plantarum* ОНУ87 сохраняется при температуре хранения -20 °С с добавлением глицерина, по сравнению к этому же показателю при температуре хранения 4 и 20 °С. Показано, что присутствие лактобацилл негативно влияет на активность каротоворицинов при хранении в смеси при температуре 20 и 4 °С. **Выводы.** Снижение активности каротоворицинов при температуре хранения 20 и 4 °С в присутствии лактобактерий, вероятнее всего, происходит за счет дестабилизации белков, которые образуют дефектные фаговые отростки, и самопроизвольного сокращения эти хвостовых отростков.

Ключевые слова: хранение, фитопатогены, бактериоцин, *Erwinia carotovora*, *Lactobacillus plantarum*.

К.Д. Krylova, Zh.Yu. Sergeeva, O.V. Basiul

Odesa National I. I. Mechnykov University, 2, Dvoryanska str.,
Odesa, 65082, Ukraine, tel.:+38 (048) 68 79 64, e-mail: k.d.krylova@gmail.com

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE LACTIC ACID BACTERIA AND CAROTOVORICENES COMPLEX AGAINST THE SOFT ROT CAUSATIVE AGENT DURING THE STORAGE

Summary

Aim. To determine correlation between the storage conditions and the activity of complex from *Erwinia carotovora* ОНУ320 carotovoricenes and *Lactobacillus plantarum* ОНУ87 active against phytopathogenic erwinias. **Materials and methods.** The complex



consists of carotovoricines (defective phage particles) from the strain *E. carotovora* OHV320, obtained by spontaneous induction, and of bacteria *L. plantarum* ONU87 (cells titer – 10^5 CFU/ml) in 1:1. The complex and each component separately were stored for 31 days at -20, 4 and 20 °C. Stability control of the individual components of the mixture (bacteriocins killer activity and lactobacilli cells titer determination) was performed during all term of storage. Carotovoricines killer activity was determined according to size and diameter of lysing zones. *L. plantarum* OHV87 viability was determined as titer after the growth on MRS agar. **Results.** For the first time the optimal storage conditions for the mixture of *L. plantarum* ONU87 live cells and *E. carotovora* OHV320 carotovoricines were determined. The negative influence of *L. plantarum* ONU87 strain on the activity of carotovoricine mixture component was shown, if it was stored at temperature 20 and 4 °C. **Conclusions.** The decrease of carotovoricines activity after the storage at 4 and 20 °C with lactobacilli possibly occurs because of destabilization of proteins that form defective phage tails and theirs selfcontraction. **Key words:** storage, phytopathogens, bacteriocins, *Erwinia carotovora*, *Lactobacillus plantarum*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Casas I. A., Dobrogosz W. J. Validation of probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. // Microb. Ecol. Health Dis. – 2000. – 38 p.
2. Witzenrath M. Time for tailored antimicrobials: adapted bacteriophages in the ICU // Crit Care Med. – 2015. – Vol. 43, № 6. –p. 1346– 1347.
3. Gill J., Hollyer T. and Sabour M. Bacteriophages and phage-derived products as antibacterial therapeutics // Expert opinion on therapeutic patents. – 2007. – Vol. 17, № 11. – P. 1341– 1350.
4. Товкач Ф.И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* / Ф.И. Товкач // Микробиология.– 2002.– Т. 71, № 3. – С. 359–367.
5. Ravensdale M., Blom T.J., Gracia-Garza J.A., Svircev A.M., and Smith R.J. Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Canadian J. of Plant Path. – 2007. – 29, № 2. – P. 121–130.
6. Limanska N., Ivanytsia T., Basiul O., Krylova K., Biscola V., Chobert J.-M., Ivanytsia V., Haertle T. Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings // Acta Physiologiae Plantarum. – 2013. – Vol. 35, № 5. – P. 1587–1595.
7. Сергеева Ж.Ю., Крилова К.Д., Ліманська Н.В., Васильєва Н.Ю., Товкач Ф.І., Іваниця В.О. Вплив *Lactobacillus plantarum* ONU 87 та автолізу бактерій *Erwinia carotovora* ZM1 на інфекційність збудників м'якої гнилі // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4 (20). – С. 16–28.
8. Сергеева Ж.Ю., Крилова К.Д., Ліманська Н.В., Васильєва Н.Ю., Іваниця В.О., Товкач Ф.І., Басюл О.В., Коротаєва Н.В. «Спосіб захисту коренеплодів та бульб від м'якої гнилі з використанням лактобацил та автолізу ервінії». Патент України на корисну модель Патент України на корисну модель № 82922. – Оpubл. 27.08.2013. – 4 с.
9. Korotaeva N.V., Kondratiuk T.V., Basiul O.V., Krylova K.D., Yamborko G.V., Ivanytsia V.O., Limanska N.V. Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU 87 in mixture



with autolysate of erwinias on formation of tumors caused by *Rhizobium radiobacter* C58 // *Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 22, № 2. – P. 6–14.

10. Головач Т.М., Л.І. Грома. Лактобацили: заморожування при низьких та ультранизьких температурах Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях. – К.: Тов. «Знання України». – 2004. – С. 39–44.

11. Крылова Е. Д. Характеристика колиспецифических бактериоцинов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ЕС 153 // *Мікробіологічний журнал*. – 2009. – № 3. – С. 25–30.

12. Limanska N., Korotaeva N., Biscola V., Ivanytsia T., Merlich A., Franco BDGM, Chobert G. M., Ivanytsia V. and Haertlé T. Study of potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Pathology & Microbiology*. – 2015. – V.6, Issue 8. – P. 1–9.

13. Ліманська Н.В., Мерліч А.Г., Іваниця В.О. Поширення *Lactobacillus plantarum* у ферментованому рослинному матеріалі з України і Франції // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. – 2016. – Т. 74. – С. 169–174.

References

1. Casas I A., Dobrogosz W J. Validation of probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2000. 38.

2. Witzenrath M. Time for tailored antimicrobials: adapted bacteriophages in the ICU *Crit Care Med.*, 2015;(6):1346– 1347.

3. Gill J, Hollyer T and Sabour M. Bacteriophages and phage-derived products as antibacterial therapeutics. *Expert opinion on therapeutic patents*, 2007;(11):1341–1350.

4. Tovkach FI. Defective lysogeny of *Erwinia carotovora*. *Microbiology*, 2002, 71;(3):359 – 367.

5. Ravensdale M, Blom TJ, Gracia-Garza JA., Svircev AM, and Smith RJ. Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Canadian J. of Plant Path.*, 2007;(29):121–130.

6. Limanska N, Ivanytsia T, Basiul O, Krylova K, Biscola V, Chobert J-M, Ivanytsia V, Haertle T. Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013;(35):1587-1595.

7. Sergeeva Zh U, Krylova K D, Limanska N V, Vasylieva N U, Tovkach F I, Ivanytsia VO. Influence of *Lactobacillus plantarum* ONU 87 and autolysate of bacteria *Erwinia carotovora* ZM1 on the soft rot causative agent infectivity. *Microbiology and virology*, 2012;(4):16 – 28.

8. . MBI A 01 N 63/00. Protective method against soft rot in tubers and roots using lactobacilli and erwinia's autolysate. Sergeeva Zh U, Krylova K D, Limanska N V, Vasylieva N U, Tovkach F I, Ivanytsia V O, Basiul O V, Korotaeva N V – N 82922; zayavl. 03.01.2013; opubl. 27.08.2013.

9. Korotaeva NV, Kondratiuk T V, Basiul OV, Krylova KD, Yamborko GV, Ivanytsia VO, Limanska NV. Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU 87 in mixture



АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ДО ЗБУДНИКА М'ЯКОЇ ГНИЛІ ...

with autolysate of erwinias on formation of tumors caused by Rhizobium radiobacter C58. *Microbiology and Biotechnology*, 2013;(22,):6 – 14.

10. Golovach TM, Groma LI *Lactobacillus*: freezing under low and ultralow tempratures. Pure culture obtaining methods and long preservation in collections, 2004:39-44.

11. Krylova KD. Characteristic of the colispecific bacteriocines of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* EC 153. *Microbiology journal*, 2009;(3):25 – 30.

12. Limanska N, Korotaeva N, Biscola V, Ivanytsia T, Merlich A., Franco BDGM, Chobert GM, Ivanytsia V and Haertlé T. Study of potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Pathology & Microbiology*, 2015;(6):1 – 9.

13. Limanska NV, Merlich AG, Ivanytsia VO. *Lactobacillus plantarum* spread in fermented plants from Ukraine and France. *Vistnyk of Lviv university. Biological section*. 2016;(74):169 – 174.

Стаття надійшла до редакції 22.11.2016 р.



П.П. Зеленая¹, Г.В. Гладка², В.В. Шепелевич¹, Ю.М. Юмына^{1*},
Н.В. Сенчило¹, Л.М. Скивка¹

¹ – ННЦ «Институт биологии и медицины» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 64/13, Киев, 01601, Украина;

² – Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. академика Заболотного, 154, Киев 03143, Украина.

* тел.0445213231, e-mail: juliayumuna@ukr.net

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМУ ИЗЛУЧЕНИЮ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ЭПИФИТНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ ЗОНЫ ОТЧУЖДЕНИЯ ЧАЭС

Цель: изучение чувствительности к УФ бактерий родов *Pseudomonas* и *Pantoea*, выделенных из эпифита растительных образцов 10 км зоны отчуждения Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС). **Методы:** Объектами исследования были выделенные из образцов эпифитной зоны растений 10 км зоны отчуждения ЧАЭС штаммы бактерий родов *Pantoea* и *Pseudomonas* и коллекционные штаммы *P. aeruginosa* УКМ В-907=АТСС 27853, *P. putida* УКМ В-115^m =АТСС 12633, *P. agglomerans* УКМ В-1089^m=АТСС 33248. Облучение микроорганизмов УФ проводили лампой БУФ-15, $\lambda=254$ нм, продолжительность облучения от 1 до 15 мин (0–600 Дж/м²). Дозу облучения (Дж/м²) определяли с помощью дозиметра ДДУ-81. **Результаты:** показатели выживаемости клеток при дозовой нагрузке 40 Дж/м² для исследуемых эпифитных штаммов *Pantoea* sp. Н8 и *Pantoea* sp. pigment находились в диапазоне от [-0,41 lg%] до [1,34 lg%]. Значения ЛД₅₀ для этих микроорганизмов были в среднем в 2,5 раза ниже аналогичных значений для клеток музейного штамма. Для исследуемых эпифитных микроорганизмов *Pantoea* sp. Н7 и *Pseudomonas* sp. Р14 показатели выживаемости при дозовой нагрузке 40 Дж/м² находились в диапазоне от [1,77 lg%] до [1,94 lg%]. ЛД₅₀ для *Pseudomonas* sp. Р14 в 3,8 раза превышала показатель музейного штамма *P. putida* АТСС 12633, ЛД₅₀ для *Pantoea* sp. Н7 была на 12,5% выше показателя соответствующего референтного штамма. Облучение в диапазоне доз 85,5±15,8 Дж/м² приводило к гибели 99,99% клеток всех взятых в опыт штаммов. **Выводы:** сообщество эпифитных бактерий родов *Pseudomonas* и *Pantoea* из 10 км зоны отчуждения ЧАЭС гетерогенно по признаку чувствительности к УФ. Для бактерий рода *Pantoea* характерна дивергенция чувствительности к данному стрессору, тогда как в популяции исследованных эпифитных псевдомонад преобладают микроорганизмы, толерантные к УФ излучению в диапазоне доз до 40 Дж/м².

Ключевые слова: эпифитные микроорганизмы, ультрафиолет, множественная стресс-толерантность.



Эпифитные микроорганизмы играют важную роль в физиологии растительного организма, выделяя витамины, ауксины, гиббереллины, которые влияют на ряд жизненно важных метаболических процессов, а также усиливают естественный иммунитет растений [7, 10, 13]. Феномен множественной стресс-толерантности микроорганизмов является одним из наименее изученных аспектов их физиологии. Особый интерес представляет стресс-чувствительность эпифитных микроорганизмов в свете современных программ по внедрению на землях, подвергшихся техногенному, в том числе радиационному, загрязнению, экологически безопасных технологий выращивания сельскохозяйственных культур [6, 9]. Постоянная экспозиция эпифитных микроорганизмов ионизирующим излучением влияет не только на состав микробных ценозов, но и приводит к изменениям эколого-физиологических свойств бактерий, в том числе их чувствительности к другим стресс-факторам. Изменение свойств микроорганизмов может сопровождаться приобретением признаков, способных влиять на характер растительно-микробного взаимодействия [5, 11].

При хроническом воздействии малых доз радиации исследуемые микроорганизмы являются наиболее уязвимой мишенью [2]. По этой причине особый интерес вызывают бактерии, выделенные из эпифитной зоны растений, произрастающих в зоне хронического влияния низкодозового радиационного излучения. Бактерии родов *Pantoea* и *Pseudomonas* являются преобладающими микроорганизмами в филлосфере растений. Для них характерно динамичное изменение метаболических реакций в ответ на действие факторов окружающей среды [7, 10, 13]. *P. putida* — часто встречающаяся сапрофитная грамотрицательная бактерия, широко используемая в технологиях биоремедиации [9]. Пигменты, свойственные псевдомонадам, выполняет функцию защиты микроорганизмов от негативного воздействия ультрафиолета [10].

Целью работы было изучение чувствительности к УФ (ультрафиолетовому излучению) бактерий родов *Pseudomonas* и *Pantoea*, выделенных из эпифита растительных образцов 10 км зоны отчуждения Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС).

Материалы и методы

Объектами исследования были выделенные из образцов эпифитной зоны растений 10 км зоны отчуждения ЧАЭС штаммы *Pantoea sp. pigment* (образует 70% пигментированных желтых и 30% беспигментных колоний), *Pantoea sp. H8* (образует беспигментные колонии), *Pantoea sp. H7* (образует беспигментные мукоидные колонии); *Pseudomonas sp. P14* (образует мукоидные колонии бежевого цвета и колонии бежевого цвета). Исследуемые бактерии изолированы из цветков *Oenothera sp.* (ослиник двулетний, энотера). Образцы растений отобраны в районе полигона «Чистогаливка», содержание радионуклеотидов в 5 см верхнего слоя грунта составляло 20650 ± 1050 Бк/кг по ^{137}Cs и 5180 ± 550 Бк/кг по ^{90}Sr . Растительные образцы были предоставлены сотрудниками Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины.



Для сравнения использовали штаммы, полученные из Украинской коллекции микроорганизмов *P. aeruginosa* УКМ В-907=АТСС 27853, *P. putida* УКМ В-115[†]=АТСС 12633, *P. agglomerans* УКМ В-1089[†]=АТСС 33248.

Цитоморфологические характеристики эпифитных микроорганизмов изучали методом трансмиссионной электронной микроскопии (Electronic microscope Jeol 1400, Japan).

Облучение микроорганизмов УФ проводили, как описано Vasileva-Tonkova et al. [12]. Десятикратные разведения (от 10^{-2} до 10^{-9}) суточных микробных суспензий вносили по 0,1 мл на чашки Петри с агаризованной средой МПА и равномерно распределяли шпателем по всей поверхности. Открытые чашки помещали на расстоянии 1 м от источника облучения (лампа БУФ-15, $\lambda=254$ нм, Украина). Продолжительность УФ облучения – от 1 до 15 мин (0-600 Дж/м²). Дозу облучения (Дж/м²) определяли с помощью дозиметра ДАУ-81 (Россия). После облучения чашки инкубировали при температуре 27 °С. УФ облучение и дальнейшую инкубацию облученных бактерий проводили в темноте, чтобы избежать фоторепарации. Подсчет выросших на чашках колоний проводили через 2 суток. Опыты проводили в 3-х повторностях.

Влияние УФ облучения на выживаемость бактерий оценивали по изменению процентного содержания выживших клеток от их исходного количества. После логарифмирования каждой величины выживаемости, вычисляли среднее (M), доверительный интервал ($m=\delta t$) по каждой дозе УФ с доверительной вероятностью $p \leq 0,05$ [1]. Для сравнения чувствительности к УФ различных монокультур, на дозовых кривых, представляющих зависимость количества выживших клеток от доз УФ, вычислены ЛД₅₀, ЛД₉₀, ЛД₉₉ и ЛД_{99,99}. Сравнение выборочных средних в дозозависимых группах проводили с помощью критерия Стьюдента с вычислением средней величины (M), доверительного интервала средней величины ($\pm m$), принимая $p \leq 0,05$ за достоверный уровень значимости.

Для статистической обработки данных использованы пакеты статистических программ электронных таблиц EXEL 2013 и STATISTIKA 7.0.

Результаты и их обсуждение

Преобладающими грамотрицательными микроорганизмами в эпифитной зоне цветков *Oenothera sp.* были бактерии родов *Pseudomonas* и *Pantoea*. Результаты биохимической идентификации, а также анализа морфолого-культуральных и физиологических свойств выделенных изолятов описаны нами ранее [8].

Анализ распределения исследуемых бактерий по критерию относительной выживаемости в диапазоне действия доз УФ от 0 до 600 Дж/м² показал, что они разделяются на две подгруппы А и В (рис. 1). В подгруппу А вошли коллекционные штаммы рода *Pseudomonas*, а также штаммы рода *Pantoea sp.* Н8 и *Pantoea sp.* pigment. В подгруппу В включены музейный штамм *P. agglomerans* АТСС 33248, штаммы *Pantoea sp.* Н7 и *Pseudomonas sp.* Р14 зоны отчуждения. Как показано на рис. 2 показатели выживаемости клеток при дозовой нагрузке 40 Дж/м² для микроорганизмов подгруппы А находились в



діапазоні від $[-0,41 \lg\%]$ до $[1,34 \lg\%]$. При цьому значення LD_{50} для всіх мікроорганізмів цієї підгрупи були значно менше 40 Дж/м^2 . При тій же дозовій навантаженні показники виживаємості мікроорганізмів підгрупи В знаходились в діапазоні від $[1,77 \lg\%]$ до $[1,94 \lg\%]$. Для мікроорганізмів цієї підгрупи відмінною особливістю були значення $LD_{50} \geq 40 \text{ Дж/м}^2$.

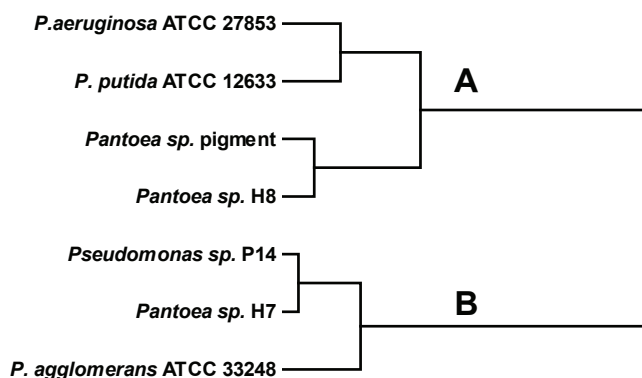


Рис. 1 Дивергенція грамотрицательных бактерий по критерию выживаемости (%) при облучении УФ в диапазоне доз от 0 до 600 Дж/м^2 .

А – средняя выживаемость при дозовой нагрузке 40 Дж/м^2 $11,7 \pm 9,2\%$ клеток ($LD_{50} < 40 \text{ Дж/м}^2$); В – средняя выживаемость при дозовой нагрузке 40 Дж/м^2 $75,9 \pm 15,1\%$ клеток ($LD_{50} \geq 40 \text{ Дж/м}^2$).

Fig.1. Divergence of gram-negative bacteria survival (%) after the irradiation with UV over the dose range 0 to 600 J/m^2 .

A – average survival rate at the dose of 40 J/m^2 is $11,7 \pm 9,2\%$ ($LD_{50} < 40 \text{ J/m}^2$), B – average survival rate at the dose of 40 J/m^2 is $75,9 \pm 15,1\%$ ($LD_{50} \geq 40 \text{ J/m}^2$).

Наивысшая среди всех исследованных культур выживаемость клеток зарегистрирована у микроорганизмов штамма *Pantoea sp. H7*. На кладограмме (рис. 1) показано, что остальные штаммы рода *Pantoea* попали в подгруппу А, с показателями выживаемости клеток ниже, чем у музейного штамма *P. agglomerans* ATCC 33248. Самые низкие показатели выживаемости оказались у коллекционных бактерий рода *Pseudomonas*. В отличие от музейных штаммов, показатели выживаемости клеток у штамма *Pseudomonas sp. P14* были близки к показателям, характерным для клеток штамма *Pantoea sp. H7*. По этому критерию штамм зоны отчуждения значительно отличался от микроорганизмов своего рода (рис. 1).

Более детальный анализ характера кривых выживаемости клеток и устойчивости к УФ радиации исследуемых микроорганизмов показал, что облучение в диапазоне доз $85,5 \pm 15,8 \text{ Дж/м}^2$ приводило к гибели $99,99\%$ клеток всех исследуемых штаммов, что характеризует изученные бактерии как чувствительные к действию УФ (рис. 2).

Экспоненциальность кривой выживаемости *P. aeruginosa* ATCC 27853 в дозовом диапазоне до 80 Дж/м^2 указывает на однородность по чувствительности

к действию УФ большей части клеток популяции (рис. 2А). Такой тип кривой был характерен только для этого штамма исследуемых микроорганизмов. Дозовая кривая клеток *P. putida* ATCC 12633 имела более пологий наклон, чем у штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 в диапазоне доз УФ до 40 Дж/м², и занимала промежуточное положение среди графиков музейных культур. Можно предположить, что в популяции штамма *P. putida* ATCC 12633 аккумулировалось большее количество клеток, обладающих необходимыми механизмами защиты от действия этого диапазона доз УФ, чем в популяции штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853.

В популяции микроорганизмов коллекционного штамма *P. putida* ATCC 12633 количество клеток, устойчивых к действию УФ этого диапазона доз, в среднем на 8,5% выше, чем у бактерий штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853. Летальные дозы УФ для микроорганизмов штамма *P. putida* ATCC 12633 были достоверно выше, чем для *P. aeruginosa* ATCC 27853 (табл. 1).

Таблица 1

Показатели устойчивости к УФ бактерий, изолированных из растений образцов зоны отчуждения ЧАЭС

Table 1

Indices of UV sensitivity of bacteria isolated from epiphyte plant samples in Chernobyl Exclusion Zone

Штамм	Летальные дозы УФ, Дж/м ²			
	ЛД ₅₀	ЛД ₉₀	ЛД ₉₉	ЛД _{99,99}
<i>Pantoea agglomerans</i> ATCC 33248	40,3±0,5 ^{1;2}	47,3±0,5 ^{1;2}	56,3±1,0 ^{1;2}	75,0±1,0 ¹
<i>Pantoea</i> sp. Pigment	14,3±0,5 ⁵	42,3±0,5 ⁴	58,3±1,0	76,3±0,6
<i>Pantoea</i> sp. H7	45,0±1,0 ^{4;6;7}	56,3±0,5 ^{5;6;7}	74,0±1,0 ^{5;6;7}	113,3±0,6 ⁵
<i>Pantoea</i> sp. H8	19,7±3,0 ^{5;6}	44,3±2,0 ³	57,0±2,0	95,6±10,1 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	5,0±0,3	15,5±1,3	33,3±0,5	66,7±1,2
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	11,3±1,8 ¹	39,3±1,0 ¹	51,0±2,0 ¹	77,0±1,0 ¹
<i>Pseudomonas</i> sp. P14	43,0±1,0 ^{1;2}	50,3±0,5 ^{1;2}	60,7±0,5 ^{1;2}	80,3±0,6 ¹

Примечание: ¹p≤0,001 по сравнению с *P. aeruginosa* ATCC 27853; ²p≤0,01 по сравнению с *P. putida* ATCC 12633; ³p≤0,05, ⁴p≤0,01, ⁵p≤0,001 по сравнению с *P. agglomerans* ATCC 33248; ⁶p≤0,01 по сравнению с *Pantoea* sp. (pigment); ⁷p≤0,01 по сравнению с *Pantoea* sp. H8.
 Note: ¹p≤0,001 compared with *P. aeruginosa* ATCC 27853; ²p≤0,01 compared with *P. putida* ATCC 12633; ³p≤0,05, ⁴p≤0,01, ⁵p≤0,001 compared with *P. agglomerans* ATCC 33248; ⁶p≤0,01 compared with *Pantoea* sp. (pigment); ⁷p≤0,01 compared with *Pantoea* sp. H8.



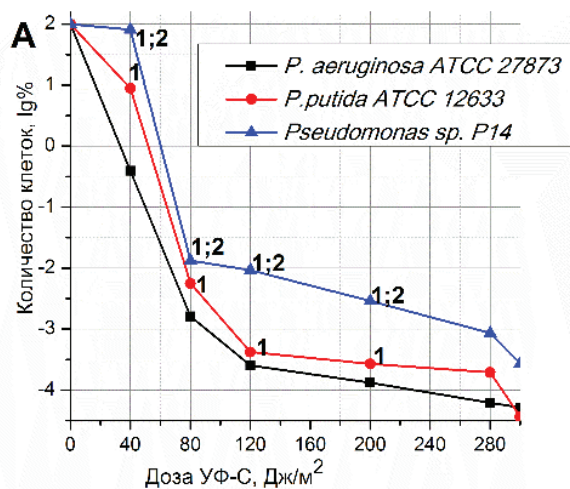


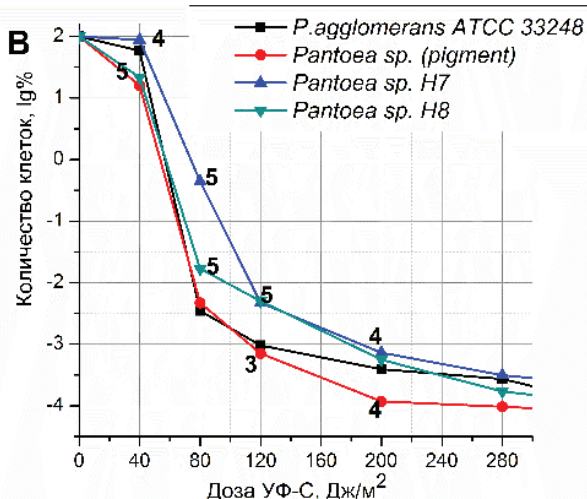
Рис. 2. Дозовая зависимость влияния УФ на выживаемость бактерий родов *Pseudomonas* (А) и *Pantoea* (В).

Примечание: ¹p≤0,001 по сравнению с *P. aeruginosa* ATCC 27853; ²p≤0,01

по сравнению с *P. putida* ATCC 12633; ³p≤0,05, ⁴p≤0,01, ⁵p≤0,001 по сравнению с *P. agglomerans* ATCC 33248.

Fig. 2. Dose dependence of the effect of UV on the survival of bacteria of the bacterial genera *Pseudomonas* (A) and *Pantoea* (B).

Note: ¹p≤0,001 compared with *P. aeruginosa* ATCC 27853; ²p≤0,01 compared with *P. putida* ATCC 12633; ³p≤0,05, ⁴p≤0,01, ⁵p≤0,001 compared with *P. agglomerans* ATCC 33248.



Дозовая кривая эпифитного штамма *Pseudomonas sp.* P14 имела сигмоидную форму, с образованием плеча репарации в диапазоне доз до 40 Дж/м². Эту дозовую нагрузку пережило 81,1±1% клеток, что на 80,7% и на 72,4% больше, чем для микроорганизмов штаммов *P. aeruginosa* ATCC 2785 и *P. putida* ATCC 12633, соответственно. ЛД-показатели для клеток штамма *Pseudomonas sp.* P14 были достоверно выше по сравнению с контрольными бактериями рода *Pseudomonas* (табл. 1). Полученные данные позволяют предположить, что бактерии эпифитного штамма *Pseudomonas sp.* P14 более адаптированы к действию УФ по сравнению с микроорганизмами музейных штаммов рода *Pseudomonas*.

Согласно литературным данным, бактерии рода *Pantoea* проявляют большую устойчивость к действию ионизирующих излучений по сравнению с другими грамотрицательными микроорганизмами [4]. При облучении УФ, сигмоидный характер кривой выживаемости клеток штамма *P. agglomerans* ATCC 33248 с пологим наклоном в диапазоне доз до 40 Дж/м² говорит о существенных различиях в чувствительности клеток в пределах популяции

к действию этого диапазона доз УФ (рис. 2В). Сигмоидный тип кривых выживания был характерен для всех бактерий рода *Pantoea*.

Доля клеток, выживших после облучения дозой 40 Дж/м² у бактерий штамма *P. agglomerans* ATCC 33248 составляла 58,7±1%. Летальные дозы УФ для клеток этого штамма были достоверно выше аналогичных показателей для музейных штаммов рода *Pseudomonas* (табл.1). Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о радиорезистентности бактерий родов *Pseudomonas* и *Pantoea* [4, 6].

Как показано на рис. 2В, клетки штамма *Pantoea sp.* Н7 формировали плечо репарации в диапазоне доз до 40 Дж/м². Дозовую нагрузку в 40 Дж/м² пережило 87,8±1,3% (1,94 lg%) клеток этого штамма, что на 29% больше, чем у микроорганизмов коллекционного штамма *P. agglomerans* ATCC 33248. Летальные дозы УФ для клеток *Pantoea sp.* Н7 были достоверно выше как по сравнению с аналогичными показателями музейного штамма, так и в сравнении с другими эпифитными штаммами рода *Pantoea* (табл. 1). Для графиков зависимости выживаемости клеток от дозы УФ у бактерий штаммов *Pantoea sp. pigment* и *Pantoea sp.* Н8 характерно увеличение наклона кривой выживаемости в диапазоне доз до 40 Дж/м² по сравнению с графиком контрольного штамма, то есть клетки этих эпифитных штаммов были похожими по чувствительности к действию УФ (рис. 2В). Для клеток этих двух штаммов показатели ЛД₅₀ и ЛД₉₀ были ниже, а показатели ЛД₉₉ не отличались от таковых для контрольного штамма. При этом абсолютная смертельная доза для клеток штамма *Pantoea sp.* Н8 достоверно выше аналогичного показателя для клеток контрольного штамма (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки изученных эпифитных штаммов *Pantoea* различались по признаку чувствительности к действию УФ в сравнении с контрольным штаммом этого рода. Бактерии *Pantoea sp.* Н7 оказались менее чувствительными к действию УФ в узком диапазоне доз по сравнению с музейным штаммом *P. agglomerans* ATCC 33248, в отличие от двух других эпифитных штаммов этого рода. Кроме того, можно предположить, что чувствительность *Pantoea sp. pigment* к действию УФ не зависит от способности к синтезу каротиноидного пигмента, т.к. штамм, обладающий способностью его образовывать, характеризовался относительно высокой УФ-чувствительностью.

Таким образом, результаты изучения влияния УФ на выживаемость исследуемых микроорганизмов, изолированных из эпифита цветков *Oenothera sp.*, произрастающих в зоне отчуждения, показали, что сообщество эпифитных бактерий гетерогенно по признаку чувствительности к данному стрессору. Для эпифитных микроорганизмов рода *Pantoea* характерно внутривидовое разнообразие по признаку УФ-чувствительности. Для бактерий эпифитного штамма *Pseudomonas sp.* Р14 показатели выживаемости клеток, а также летальные дозы ультрафиолета значительно превышали аналогичные показатели для клеток музейных штаммов, что свидетельствует в пользу накопления в эпифитной зоне *Oenothera sp.* зоны отчуждения бактерий, толерантных к действию УФ в дозовом диапазоне до 40 Дж/м².



П.П.Зелена¹, Г.В. Гладка², В.В. Шепелевич¹, Ю.М. Юмина^{1*},
Н.В. Сенчило¹, Л.М. Сківка¹

¹ – ННЦ «Інститут біології і медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, місто Київ, 01601, Україна;

² – Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. академіка Заболотного, 154, Київ 03143, Україна.

* тел.0445213231, e-mail: juliayumuna@ukr.net

ЧУТЛИВІСТЬ ДО УЛЬТРАФІОЕТОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ГРАМНЕГАТИВНИХ ЕПІФІТНИХ БАКТЕРІЙ З ЗОНИ ВІДЧУЖЕННЯ ЧАЕС

Реферат

Мета: вивчення чутливості до УФ бактерій родів *Pseudomonas* та *Pantoea*, виділених з епіфіту рослинних зразків 10 км зони відчуження Чорнобильської атомної електростанції (ЧАЕС). **Методи:** Об'єктами дослідження були виділені зі зразків епіфітної ділянки рослин 10 км зони відчуження ЧАЕС штами бактерій родів *Pantoea* і *Pseudomonas* та колекційні штами *P. aeruginosa* УКМ В-907=АТСС 27853, *P. putida* УКМ В-115^m=АТСС 12633, *P. agglomerans* УКМ В-1089^m=АТСС 33248. Опромінення мікроорганізмів УФ проводили лампою БУФ-15, $\lambda=254$ нм, тривалість опромінення від 1 до 15 хв (0-600 Дж/м²). Дозу опромінення (Дж/м²) визначали за допомогою дозиметру ДАУ-81. **Результати:** показники виживаності клітин за дозового навантаження 40 Дж/м² для досліджених епіфітних мікроорганізмів *Pantoea* sp. Н8 та *Pantoea* sp. pigment були в діапазоні від [-0,41 lg%] до [1,34 lg%]. Значення ЛД₅₀ для цих мікроорганізмів були в середньому в 2,5 разу нижчими від аналогічних значень для клітин музейного штаму. Для досліджених епіфітних мікроорганізмів штампів *Pantoea* sp. Н7 та *Pseudomonas* sp. Р14 показники виживаності за дозового навантаження 40 Дж/м² були в діапазоні від [1,77 lg%] до [1,94 lg%]. ЛД₅₀ для *Pseudomonas* sp. Р14 у 3,8 разу перевищувала показник музейного штаму *P. putida* АТСС 12633, ЛД₅₀ для *Pantoea* sp. Н7 була на 12,5% вищою за показник відповідного референтного штаму. Опромінення в діапазоні доз 85,5±15,8 Дж/м² спричиняло загибель 99,99% клітин усіх взятих у дослід штампів. **Висновки:** угруповання епіфітних бактерій родів *Pseudomonas* та *Pantoea* з 10 км зони відчуження ЧАЕС гетерогенне за ознакою чутливості до УФ. Для бактерій роду *Pantoea* характерна дивергенція чутливості до даного стресору, у той час як у популяції досліджених епіфітних псевдомонад переважають мікроорганізми, толерантні до УФ випромінювання в діапазоні доз до 40 Дж/м².

Ключові слова: епіфітні мікроорганізми, ультрафіолет, множинна стрес-толерантність.



**P. Zelena¹, G. Gladka², V. Shepelevych¹, Iu. Yumyna¹, N. Senchylo,
L. Skivka¹**

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, NSC "Institute of Biology" 64/13,
Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 01601

²Institute of Microbiology and Virology NASU of Ukraine, 154, Zabolotny str., Kyiv, 03143 Ukraine
* тел.0445213231, e-mail: juliayumuna@ukr.net

**SENSITIVITY TO UV-C OF GRAMNEGATIVE EPIPHYTIC
BACTERIA FROM CHERNOBYL EXCLUSION ZONE**

Summary

Aim: to study the sensitivity to UV of the bacterial genera *Pseudomonas* and *Pantoea* from the epiphyte of plant samples from 10 km of Chernobyl Exclusion Zone (CEZ).

Methods: The objects of the study were the strains of bacteria of the genera *Pantoea* and *Pseudomonas* isolated from plant epiphyte samples from 10 km of CEZ and the collection strains of *P. aeruginosa* UKM B-907 = ATCC 27853, *P. putida* UKM B- B-115^m = ATCC 12633, *P. agglomerans* UKM B – B-1089^m = ATCC 33248. UV irradiation of microorganisms was carried out using BUF-15 lamp, $\lambda = 254$ nm, exposure time from 1 to 15 min (0–600 J / m²). The dose of irradiation (J / m²) was determined using a DAU-81 dosimeter. **Results:** Indices of UV sensitivity at the dose of 40 J/m² for investigated epiphytic strains *Pantoea* sp. H8 and *Pantoea* sp. pigment were over the range from [-0.41 lg%] to [1.34 lg%]. LD₅₀ for these microorganisms were 2.5 times lower than that for corresponding museum strain. Indices of UV sensitivity at the dose of 40 J/m² for microorganisms from the strains *Pantoea* sp. H7 and *Pseudomonas* sp. P14 were over the range from [1.77 lg%] до [1.94 lg%]. LD₅₀ for *Pseudomonas* sp. P14 was 3.8 times higher than that for reference bacteria *P. putida* ATCC 12633, and LD₅₀ for *Pantoea* sp. H7 was 12.5% higher than that for corresponding reference strain. Irradiation over the dose range 85.5±15.8 J/m² resulted in 99.99% cell death rate for all investigated strains. **Conclusion:** community of epiphytic bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Pantoea* from 10 km of CEZ is heterogeneous in its sensitivity to UV. Bacteria of the genus *Pantoea* are characterized by the divergence of the sensitivity to this stressor, whereas epiphytic pseudomonads were represented by microorganisms that were tolerant to the UV radiation over the dose range 0–40 J/m².

Key words: epiphytic bacteria, UV, multiple stress-tolerance.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова ИВ. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов / – Л.: Наука, 1984. – 144с.
2. Красавин Е.А. Факторы, определяющие характер кривых выживания бактерий *Escherichia coli* при действии излучений с разной линейной передачей энергии. Особенности организации генома и форма кривых выживания / Объединенный институт ядерных исследований/ Дубна, 1984. – 12 с.
3. Милько Е.С., Котова И.Б., Нетрусов А.Б. Процесс диссоциации у бактерий: Учебное пособие – М.: МАКС Пресс, 2007. – 68 с.
4. Dussault D., Caillet S., Le Tien C., Lacroix M. / Carotenoids' influence on radiotolerance of *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen // Lett. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 47. – P. 208–213.



5. Egorova A.S., Gessler N.N., Ryazanova L.P., Kulakovskaya T.V., Belozerskaya T.A. Stress Resistance Mechanisms in the Indicator Fungi from Highly Radioactive Chernobyl Zone Sites // *Mikrobiologiya*. – 2015. – 84(2). – P. 184–191.

6. *Environmental remediation and restoration of contaminated nuclear and NORM sites.* / edited by Leo van Velzen. – London: Woodhead Publishing, 2015. – 261 p.

7. Farrar K., Bryant D., Cope-Selby N. Understanding and engineering beneficial plant-microbe interactions: plant growth promotion in energy crops // *Plant Biotechnol. J.* – 2014. – V. 12, No. 9. – P. 1193–1206.

8. Halloom A.A., Zelena P., Shevchenko J., Berezhna V., Shilina J., Gusha M., Molozhava O., Umina I., Shepelevych V., Voychuk S. Phytopathogenic activity of bacteria found in plants gathered in areas with radioactive contamination. // Proceeding of the conference «The top actual researches in modern science». (Dubai, July, 2015): Rost Publishing, 2015. – Vol. II. – P. 37–45.

9. Ibrahim M., Adrees M., Rashid U., Raza S.H., Abbas F. Chapter 21 Phytoremediation of radioactive contaminated soils // In book: *Soil Remediation and Plants*, Publisher: Academic Press, Editors: Khalid Rehman, Hakeem Muhammad, Sabir Münir, Öztürk Ahmet, Ruhi Mermut. – 2015. – P. 599-627. doi: 10.1016/B978-0-12-799937-1.00021-8.

10. Rastogi G., Coaker G.L., Leveau J.H. New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches // *FEMS Microbiol Lett.* – 2013. – 348(1). – P. 1–10. doi: 10.1111/1574-6968.12225.

11. Shukla M., Chaturvedi R., Tamhane D., Vyas P., Archana G., Apte S., Bandekar J, Desai A. Multiple-stress tolerance of ionizing radiation-resistant bacterial isolates obtained from various habitats: correlation between stresses // *Curr Microbiol.* – 2007. – 54(2). – P. 142–148.

12. Vasileva-Tonkova E., Romanovskaya V., Gladka G., Gouliamova D., Tomova I., Stoilova-Disheva M., Tashyrev O. Ecophysiological properties of cultivable heterotrophic bacteria and yeasts dominating in phytocenoses of Galindez Island, maritime Antarctica // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – 30. – P. 1387–1398.

13. Vorholt J.A. Microbial life in the phyllosphere // *Nat Rev Microbiol.* – 2012. – 10(12). – P. 828-840. doi: 10.1038/nrmicro2910.

References:

1. Zaharov IA, Kozhin SA, Kozhina TN, Fedorova IV. *Experimental Technics in Genetics of Saccharomyces Yeast.* Nauka, Leningrad, 1984. 144.

2. Krasavin EA. Factors Determinating the Shape of Survival Curves of *Escherichia coli* Cells Irradiated by Ionizing Radiation with Different LET. Peculiarities of Genom Organization and the Shape of Survival. Joint Institute for Nuclear Research, 1984. 12.

3. Milko ES, Kotova IB, Netrusov AB. The process of bacterial dissociation. Textbook. MAX Press, Moscow, 2007. 68 P.



4. Dussault D, Caillet S, Le Tien C, Lacroix M./ Carotenoids' influence on radiotolerance of *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen. Lett. Appl. Microbiol. 2008;47:208-213. Rastogi G, Coaker GL, Leveau JH. New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. FEMS Microbiol Lett. 2013;348(1):1–10. doi: 10.1111/1574-6968.12225.
5. Egorova AS, Gessler NN, Ryazanova LP, Kulakovskaya TV, Belozerskaya TA. Stress Resistance Mechanisms in the Indicator Fungi from Highly Radioactive Chernobyl Zone Sites. Mikrobiologiya. 2015;84(2):184-191. Vorholt J.A. Microbial life in the phyllosphere. Nat Rev Microbiol. 2012;10(12):828-840. doi: 10.1038/nrmicro2910.
6. Environmental remediation and restoration of contaminated nuclear and NORM sites. Edited by Leo van Velzen. London: Woodhead Publishing. 2015. 261.
7. Farrar K, Bryant D, Cope-Selby N. Understanding and engineering beneficial plant-microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. Plant Biotechnol. J. 2014;12(9):1193-1206.
8. Halloom AIA, Zelena P, Shevchenko J, Berezhna V, Shilina J, Gusha M, Molozhava O, Umina Iu, Shepelevych V, Voychuk S. Phytopathogenic activity of bacteria found in plants gathered in areas with radioactive contamination. In: Proceeding of the conference «The top actual researches in modern science», Dubai, Ajman, UAE. 2015:37-45.
9. Ibrahim M, Adrees M, Rashid U, Raza SH, Abbas F. Chapter 21 Phytoremediation of radioactive contaminated soils. In book: Soil Remediation and Plants, Publisher: Academic Press, Editors: Khalid Rehman, Hakeem Muhammad, Sabir Münir, Öztürk Ahmet.
10. Rastogi G, Coaker GL, Leveau JH. New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches // FEMS Microbiol Lett. – 2013. – 348(1). – P. 1-10. doi: 10.1111/1574-6968.12225.
11. Shukla M, Chaturvedi R, Tamhane D, Vyas P, Archana G, Apte S, Bandekar J, Desai A. Multiple-stress tolerance of ionizing radiation-resistant bacterial isolates obtained from various habitats: correlation between stresses // Curr Microbiol. – 2007. – 54(2). – P.142-148.
12. Vasileva-Tonkova E, Romanovskaya V, Gladka G, Gouliamova D, Tomova I, Stoilova-Disheva M, Tashyrev O. Ecophysiological properties of cultivable heterotrophic bacteria and yeasts dominating in phytocenoses of Galindez Island, maritime Antarctica // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2014. –30. –P. 1387–1398.
13. Vorholt JA. Microbial life in the phyllosphere // Nat Rev Microbiol. – 2012. – 10(12). – P. 828-840. doi: 10.1038/nrmicro2910.

Стаття надійшла до редакції 07.02.2017 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, біосенсиори, діагностикуми, мікробні технології в сільському господарстві, мікробні технології у харчовій промисловості; захист та оздоровлення навколишнього середовища; отримання енергоносіїв та нових матеріалів тощо.

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

Рубрики журналу: «Оглядіві та теоретичні статті», «Експериментальні праці», «Дискусії», «Короткі повідомлення», «Хроніка наукового життя», «Сторінки історії», «Ювілеї і дати», «Рецензії», «Книжкова полиця».

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

До друку приймаються рукописи (2 примірники) обсягом не більше 15 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди – до 30 стор., рецензії – до 3 стор., короткі повідомлення – до 2 стор. Відхилені рукописи не повертаються.

До рукопису додається електронний варіант рукопису 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 додаються реферати українською, російською та англійською мовами.

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 аббревіатури 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).

– Молекулярну масу (Мм) – Да (дальтони) або кДа.

– При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.

– Активність ферментів виражають в мкмолях використаного субстрату або утвореного продукту за 1 хв на 1 мг протеїну або використати стандартну одиницю активності U (IU) і катал (скорочено кат), питома активність ензиму виражається в 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 посилань літератури

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

На книги

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

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

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

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

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

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

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



На журнальні статті

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

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

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

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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

Зразки посилань літератури в романській абетці.**References**

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

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

Статті в журналах:

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

Klochkov VK, Kavok NS, Malyukin YuV. The effect of specific interaction of nanocrystals GdYVO₄:Eu³⁺ with cell nuclei. Dop Nats Akad Nauk Ukr. 2010;(10):81–86.



Книги:

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

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

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

Матеріали з'їздів, конференцій:

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

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

Дисертаційні роботи:

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/vol15/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.



**АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ,
ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ
«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2016 РОЦІ**

Автори	№ вип.	№ стор.
Абдуліна Д.Р., Пуріш Л.М., Асауленко Л.Г., Іутинська Г.О. Сульфідогенні мікробні угруповання техногенно-трансформованих ґрунтів	2	16
Асауленко Л.Г. див. Абдуліна Д.Р.	2	16
Бабій Н.О. Вертикальна трансмісія вірусу імунодефіциту людини за результатами молекулярно-генетичних досліджень	4	28
Баранов Ю.О. див. Гончаров В.О.	1	47
Басюл О.В. див. Сергєєва Ж.Ю.	4	50
Басюл О.В. див. Страшинова І.В.	2	61
Білий О.І. див. Василів О.М.	4	42
Білявська Л.О. див. Паньківська Ю.Б.	4	60
Блайда І.А. див. Васильєва Т.В.	3	43
Блайда І.А., Васильєва Т.В., Хитрич В.Ф., Васильєва Н.Ю., Джамбек О.І., Джамбек О.А. Фізико-хімічна та мікробіологічна характеристика породних відвалів збагачення вугілля	2	75
Булигіна Т.В., Варбанець Л.Д., Пасічник Л.А., Житкевич Н.В. Резистентність до антимікробних препаратів бактерій <i>Pantoea agglomerans</i>	1	68
Ванот Б. див. Волніцка О.	3	21
Варбанець Л.Д. див. Булигіна Т.В.	1	68
Василів О.М., Масловська О.Д., Гнатуш С.О., Білий О.І., Ференсович Я.П. Генерування електричного струму <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> IMV В-7384 за внесення ферум (III) цитрату, фуксину і метиленового синього	4	42
Васильєва Н.Ю. див. Блайда І.А.	2	75
Васильєва Н.Ю. див. Васильєва Т.В.	3	43
Васильєва Н.Ю., Горикова О.Г. Оптимізація складу живильного середовища для <i>Pseudomonas maltophilia</i> ONU329 – сорбента йонів важких металів та деструктора вуглеводнів нафти	1	76
Васильєва Т.В. див. Блайда І.А.	2	75
Васильєва Т.В., Блайда І.А., Слюсаренко Л.І., Васильєва Н.Ю., Хитрич В.Ф. Бактеріальне вилуговування металів з відходів флотаційного збагачення вугілля за участю тіосульфату, двох- і тривалентного заліза	3	43
Виходцева Ю.М. див. Гончаров В.О.	1	47



Автори	№ вип.	№ стор.
Волніцка О., Ванот Б. Сучасні методи діагностики і терапії <i>Helicobacter pylori</i>	3	21
Гаврилюк Т.І. див. Сергєєва Ж.Ю.	4	50
Галкін Б.М. див. Галкін М.Б.	4	6
Галкін М.Б. див. Семенець А.С.	1	19
Галкін М.Б., Іваниця В.О., Галкін Б.М., Філіпова Т.О. Матрикс біоплівки – хімічний склад, структура, властивості	4	6
Гармашева І.Л. Розповсюдження генів ентероцинів серед штамів ентерококів, ізольованих з шлунково-кишкового тракту людини	2	30
Гвоздяк П.І. Електроутримування як рушійна сила злагодженої роботи ензимів на мембранах живих клітин	3	6
Гнатуш С.О. див. Василів О.М.	4	42
Голембіовська С.Л., Поліщук Л.В., Коцюк А.Ю., Мацелюх Б.П. Лімітуючі каротиногенез умови культивування мутантів <i>Streptomyces globisporus</i> 1912	1	29
Гончаров В.О., Котлік Л.С., Ісакова Н.П., Виходцева Ю.М., Баранов Ю.О. Розповсюдження та генотипова структура ротавірусів в Одеській області	1	47
Горшкова О.Г. див. Васильєва Н.Ю.	1	76
Горшкова О.Г. див. Сергєєва Ж.Ю.	4	50
Джамбек О.А. див. Блайда І.А.	2	75
Джамбек О.І. див. Блайда І.А.	2	75
Доброва Г.О., Замбрібориц І.С., Шестопал О.Л., Ружицька О.М. Чутливість до андрогенезу <i>in vitro</i> полби звичайної <i>Triticum dicoccum</i> (Schrank) Schuebl	2	54
Древаль Д.В. див. Нечипуренко О.О.	4	86
Житкевич Н.В. див. Булигіна Т.В.	1	68
Загородня С.Д. див. Паньківська Ю.Б.	4	60
Замбрібориц І.С. див. Доброва Г.О.	2	54
Зінченко О.Ю., Мірось С.Л. Антагоністична активність метаболітів макроміцетів щодо умовно-патогенних бактерій	3	69
Іваниця В.О. див. Галкін М.Б.	4	6
Іваниця В.Ю. див. Маринова І.І.	1	40
Ісакова Н.П. див. Гончаров В.О.	1	47
Іутинська Г.О. див. Абдуліна Д.Р.	2	16
Іутинська Г.О. див. Ямборко Н.А.	4	96
Капрельянци Л.В., Трезуб Н.С. Селензбагачені пробіотичні продукти функціонального призначення	1	6



Автори	№ вип.	№ стор.
Кириченко О.В. Біологічна активність ризосферного ґрунту пшениці ярої в асоціації з бактеріями <i>Azotobacter chroococcum</i> T79, модифікованими N-ацетил-D-глюкозаміном	3	30
Котлік Л.С. див. Гончаров В.О.	1	47
Коцюк А.Ю. див. Голембіовська С.Л.	1	29
Кузнєцов В.О. Одеський період життя та наукової діяльності академіка Д.К. Заболотного (28.12.1866 – 15.12.1929)	4	108
Леонова Н.О. див. Ямборко Н.А.	4	96
Ліманська Н.В. див. Маринова І.І.	1	40
Ліманська Н.В. див. Мерліч А.Г.	4	71
Маринова І.І., Іваніца В.Ю., Ліманська Н.В. Чисельність ендосферної мікробіоти пагонів винограду	1	40
Масловська О.Д. див. Василів О.М.	4	42
Матковська А.І. див. Страшинова І.В.	2	61
Мацелюх Б.П. див. Голембіовська С.Л.	1	29
Мерліч А.Г., Ліманська Н.В. Антагоністична активність бактерій <i>Lactobacillus plantarum</i> , виділених з рослинних джерел України та Франції, проти фітопатогенних бактерій	4	71
Миколаєвський В.П., Сергієнко В.Г., Титова Л.В. Вплив інокулянтів на формування симбіотичних систем, розвиток хвороб та продуктивність сої різних сортів	3	57
Михайленко Н.Ф. Ріст та фотосинтетична активність зелених водоростей <i>Chlorella vulgaris</i> Веїєр. в присутності наноаквахелатів селену	2	6
Мірось С.Л. див. Зінченко О.Ю.	3	69
Назаренко Г.М. див. Сергєєва Ж.Ю.	4	50
Нечипуренко О.О., Древаль Д.В., Провозін Д.Д., Собко І.О. Аденовірусна інфекція, як одна з можливих причин жирового гепатозу у одноденних курчат	4	86
Паньківська Ю.Б., Білявська Л.О., Повниця О.Ю., Загородня С.Д. Вивчення антиаденовірусної дії фторвмісних сполук нуклеозидної та нуклеозидної природи	4	60
Пасічник Л.А. див. Булигіна Т.В.	1	68
Петросьянц А.П. Виділення α -галактозидази з <i>Bifidobacterium longum</i> ЛМ-6, та ідентифікація функціональних груп каталітичного центру ферменту	1	89
Повниця О.Ю. див. Паньківська Ю.Б.	4	60
Поліщук Л.В. див. Голембіовська С.Л.	1	29
Провозін Д.Д. див. Нечипуренко О.О.	4	86
Пуріш Л.М. див. Абдуліна Д.Р.	2	16



Автори	№ вип.	№ стор.
<i>Ружицька О.М. див. Добрава Г.О.</i>	2	54
<i>Русакова М.Ю.</i> Утворення полівидової біоплівки молочнокислими бактеріями <i>Lactobacillus plantarum</i> P17630 та дріжджоподібними грибами <i>Candida albicans</i> ATCC 18804	2	41
<i>Семенець А.С., Галкін М.Б., Філіпова Т.О.</i> Утворення біоплівки штамми <i>Pseudomonas aeruginosa</i> з різним рівнем біосинтезу циклічного дигуанозинмонофосфату	1	19
<i>Сергеева Ж.Ю., Басюл О.В., Горішкова О.Г., Гаврилюк Т.І., Назаренко Г.М.</i> антагоністична активність лактобактерій, ізольованих із ферментованих рослинних продуктів із В'єтнаму	4	50
<i>Сергієнко В.Г. див. Миколаєвський В.П.</i>	3	57
<i>Слюсаренко Л.І. див. Васильєва Т.В.</i>	3	43
<i>Собко І.О. див. Нечипуренко О.О.</i>	4	86
<i>Страшнова І.В., Матковська А.І., Басюл О.В.</i> Створення і оцінка біотехнологічної цінності композицій лактобактерій	2	61
<i>Титова Л.В. див. Миколаєвський В.П.</i>	3	57
<i>Ткаченко Н.А.</i> Заквашувальні композиції бактерій для технологій кисломолочних продуктів дитячого харчування	1	55
<i>Трегуб Н.С. див. Капрельянци Л.В.</i>	1	6
<i>Ференсович Я.П. див. Василів О.М.</i>	4	42
<i>Філіпова Т.О. див. Галкін М.Б.</i>	4	6
<i>Філіпова Т.О. див. Семенець А.С.</i>	1	19
<i>Хитрич В.Ф. див. Блайда І.А.</i>	2	75
<i>Хитрич В.Ф. див. Васильєва Т.В.</i>	3	43
<i>Шестопап О.Л. див. Добрава Г.О.</i>	2	54
<i>Ямборко Н.А., Леонова Н.О., Іутинська Г.О.</i> Синтез фітогормонів ґрунтовими мікроорганізмами-деструкторами хлорорганічних сполук	4	96



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 В. Г. Вітвицька

Підписано до друку 23.03.2017 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 10,32. Тираж 100 пр.
Зам. № 1565.

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

