

**Н.В. Ткачук<sup>1</sup>, Л.Б. Зелена<sup>2</sup>, В.С. Парминська<sup>1</sup>, В.О. Янченко<sup>1</sup>,  
А.М. Демченко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г. Шевченка,  
вул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернігів, 14013, Україна

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

## **ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕТЕРОТРОФНИХ БАКТЕРІЙ ФЕРОСФЕРИ ҐРУНТУ ТА ЇХ ЧУТЛИВІСТЬ ДО ПЕСТИЦИДУ ЛІНУРОН**

З мікробного угруповання феросфери ґрунту виділено три штами гетеротрофних амоніфікувальних та залізовідновлювальних бактерій, які за комплексом мікробіологічних ознак, фізіолого-біохімічних властивостей та на основі сиквенсу фрагмента гена 16S рРНК (за результатами філогенетичного аналізу) віднесено до видів *Bacillus simplex*, *Streptomyces gardneri* та роду *Fictibacillus* sp. Нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК зареєстровані у базі даних GenBank. Досліджено чутливість бактерій виділених штамів до похідних сечовини на основі пестициду лінурон. Встановлено високу чутливість штамів *B. simplex* ChNPU F1 і *S. gardneri* ChNPU F3 та слабку штаму *Fictibacillus* sp. ChNPU ZVB1. Визначено, що для захисту від мікробної корозії перспективною сполукою з антибактеріальними властивостями є похідна з фрагментом антипірину. Встановлено можливість зменшення токсичності лінурону щодо ґрунтових бактерій введенням у його молекулу фрагменту піперидину.

*Ключові слова:* феросфера, гетеротрофні амоніфікувальні бактерії, гетеротрофні залізовідновлювальні бактерії, фенотипові ознаки, ген 16S рРНК, бактеріциди, пестицид лінурон.

На більшості металевих конструкцій, у феросфері ґрунту виділяють бактерії різних еколого-трофічних груп: тіонові, денітрифікувальні, амоніфікувальні, вуглеводнеокиснювальні, залізовідновлювальні, сульфатвідновлювальні. Вони прикріплюються до поверхні металу або захисного покриття, створюють біоплівку і викликають мікробну корозію [2]. При дослідженнях процесів мікробної корозії значну увагу приділяють сульфатвідновлювальним бактеріям, проте умови для їх розвитку створюють гетеротрофи, зокрема амоніфікувальні (АМБ) та залізовідновлювальні бактерії (ЗВБ) [2]. Так, АМБ утворюють амоніак (корозійно небезпечний метаболіт) та створюють умови для розвитку сульфатвідновлювальних бактерій: споживають кисень, знижують окисно-відновний потенціал ґрунту, виділяють деякі продукти метаболізму, що використовуються сульфатвідновлювальними бактеріями [2]. Залізовідновлювальні бактерії також створюють умови для розвитку сульфатвідновлювальних бактерій, забезпечуючи відновлення Fe(III) до Fe(II) [2]. Крім того, Fe<sup>2+</sup>-іони, що входять до складу активних центрів деяких окисно-відновних ферментів мікроорганізмів, активують життєдіяльність усієї агресивної мікробної сукупності. Поряд з цим, в амоніфікувальних та залізовідновлювальних

бактерій сульфیدогенного угруповання виявлено позахромосомні елементи, що може визначати функціонування угруповання у цілому [1]. Отже, дослідження окремих гетеротрофних представників феросфери ґрунту набуває важливого значення, визначає потребу у використанні чистих тест-культур АМБ та ЗВБ у дослідженнях сполук-бактерицидів.

Наразі сполуки з бактерицидною активністю щодо корозійно активних бактерій відомі серед гетероциклічних похідних некондиційних пестицидів [4, 10]. Показано, що чисельність сульфатвідновлювальних, денітрифікувальних та сапрофітних бактерій змінюється за дії ряду пестицидів і встановлено антикорозійну активність пестицидів рамроду та симазину за умов ґрунтової корозії [11]. До заборонених щодо використання пестицидів належить і лінурон [7], утилізація якого може бути здійснена шляхом хімічної модифікації з одержанням бактерицидів для захисту від мікробної корозії [8]. На основі діючої речовини лінурону синтезовано нові похідні, антибактеріальні властивості яких ще не досліджено. Тому метою даної роботи було виділення гетеротрофних бактерій з феросфери ґрунту, дослідження їх здатності утворювати деякі корозійно небезпечні метаболіти та ідентифікація за допомогою мікробіологічних, фізіолого-біохімічних і молекулярно-генетичних методів з метою їх подальшого використання як тест-культур при дослідженні антибактеріальних властивостей похідних речовини на основі пестициду лінурон.

**Матеріали та методи.** Виділення штамів бактерій проводили методом Коха [6] з ґрунту (феросфера), відібраного з глибини 0,7 м, що безпосередньо контактував з поверхнею металевої конструкції (опора огорожі) при поверхневому посіві розведення на МПА та у рідкому середовищі FWA-Fe(III)цитрат [18], інокульованому ґрунтом феросфери. Ізоляти бактерій отримували інкубацією за температури 29°C протягом декількох тижнів за аеробних та мікроаерофільних умов у рідкому середовищі (повністю заповнюючи пробірки середовищем та закриваючи їх гумовими пробками), та анаеробних умов у щільному середовищі (методом Штурм Л.Д. у модифікації Дуди В.І.) [5].

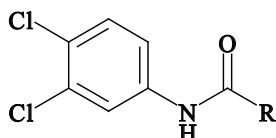
Для вивчення морфології бактерій використовували світлову мікроскопію (мікроскоп Delta Optical Genetic Pro) за збільшення (x400 та x1000). Препарати клітин мікроорганізмів забарвлювали за Грамом у модифікації Калини для визначення грамналежності, за методом Дюгіда для виявлення капсул, за методом Ганзена для виявлення спор [3, 6]. Дослідження фізіолого-біохімічних властивостей бактерій штамів здійснювали загальновідомими методами [3, 6]. Дослідження здатності виділених штамів до утворення деяких корозійно небезпечних метаболітів здійснювали загальноприйнятими методами [9]: амоніак – за зміною кольору лакмусового папірця, сірководень – за зміною кольору папірця, просоченого сіллю плюмбуму, целюлази – за здатністю руйнувати фільтрувальний папір при культивуванні на середовищі Гетчинсона.

Для встановлення систематичного положення виділених бактерій проводили секвенування гена 16S рРНК з використанням праймерів 27f та 1492g згідно з протоколом, наведеним у роботі Lane et al. [17]. Філогенетичний аналіз проводили за допомогою програми MEGA 6.0 [19].

Виділені бактерії використовували як тест-культури при дослідженні

антибактеріальних властивостей похідних лінуруну. Застосовували метод дифузії у агар [9] з використанням стерильних паперових дисків з концентрацією сполук 2,0%. Чутливість бактерій оцінювали шляхом вимірювання діаметру затримки росту бактерій навколо диску. Умови культивування бактерій наведено у роботах [12, 13].

Досліджували діючу речовину пестициду лінурун (N'-(3,4-дихлорфеніл)-N-метокси-N-метилсечовина) (I) та його похідні (II-VII) (рис. 1), синтезовані реакцією переамідування лінуруну з відповідними амінами. Будова синтезованих сполук доведена на основі даних спектроскопії протонного магнітного резонансу.



Сполука	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
R								

Рис. 1. Формули похідних сечовини на основі пестициду лінурун

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel.

**Результати та обговорення.** У результаті первинного аналізу зразків феросфери ґрунту було виділено десять ізолятів гетеротрофних мікроорганізмів, які проаналізовано та відібрано за властивістю формувати корозійно небезпечні метаболіти.

*Здатність бактерій виділених штамів до утворення деяких корозійно небезпечних метаболітів.* Серед корозійно небезпечних метаболітів бактерій важливими є сірководень, амоніак та ферменти целюлази. Зокрема, ці метаболіти визначають шкодочинну активність бактерій щодо металів та ізоляційних покриттів [2]. Тому нами перевірено здатність бактерій виділених штамів до утворення цих метаболітів.

У результаті проведеного аналізу штамів зі здатністю до утворення целюлаз виявлено не було, однак були відібрані штами, що утворюють амоніак та сірководень. Подальші дослідження проводили з трьома відібраними штамами гетеротрофних бактерій: штами ChNPU F1 та ChNPU F3 з амоніфікувальними властивостями, штам ChNPU ZVB1, який проявляв одночасно амоніфікувальні та залізівідновлювальні властивості, а також утворював сірководень. Таким чином, виділені штами гетеротрофних бактерій є потенційно корозійно небезпечними.

Наступним етапом наших досліджень було ідентифікувати виділені штами за комплексом мікробіологічних ознак, фізіолого-біохімічних властивостей та філогенетичним аналізом.

*Ідентифікація бактерій, виділених з феросфери ґрунту.* Характеристика бактерій виділених штамів наступна.

Штам *ChNPU F1* виділяли, культивували та зберігали на МПА, на якому за температури 29°C бактерії виростають за 1-у добу. Колонії поверхневі, сірвато-білого кольору, діаметром 1-2 мм (1 доба) та 3-6 мм (2 доби). Форма колоній округла, краї нерівні, хвилясті. Профіль опуклий, структура однорідна, поверхня гладенька, блискуча. Консистенція м'яка. Колонії напівпрозорі, опалесціуючі у прохідному світлі через 18 годин культивування. На 2-у добу колонії непрозорі. На 7-у добу колонії стають концентричними, профіль набуває конусоподібного вигляду.

Клітини у молодій культурі (18 год) паличкоподібні, довжиною  $5,80 \pm 0,25$  мкм, з заокругленими кінцями, розташовуються по 1-2 клітини (рис. 2), слаборухливі, грамнегативні. У старій культурі (2 міс.) клітини паличкоподібні з заокругленими кінцями, розташовуються по 1-2 клітини, у ланцюгах по 4 та більше клітин, слаборухливі, грамнегативні. Клітини мають капсули; утворюють центрально розташовані ендоспори.

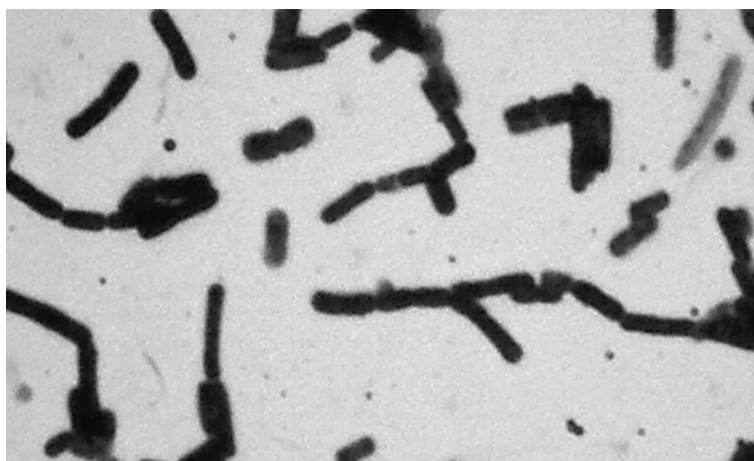


Рис. 2. Мікрофотографія клітин штаму *ChNPU F1* під світловим мікроскопом, імерсія, збільшення  $\times 1000$

При рості бактерій у м'ясо-пептонному бульйоні розчин помірно рівномірно каламутний, плівка тонка, гладенька; запаху немає; пігментації немає; осад значний, пухкий. Бактерії здатні до росту на картопляному агарі, пептонно-дріжджовому агарі та середовищі Чапека. Слабкий ріст відмічено на крохмало-аміачному агарі.

Бактерії каталазопозитивні; оксидазонегативні; аероби; цитрат утилізують; індол не утворюють; сірководень не утворюють; мурашинокисле бродіння не здійснюють; казеїн не гідролізують; температурний оптимум 19-33°C, але здатні до росту при 5°C.

За культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними властивостями згідно з *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [14] виділені бактерії можна віднести до родини *Bacillaceae*. Проведений порівняльний аналіз сиквенсу фрагмента гена 16S рРНК розміром 1268 п.н. досліджуваного штаму із задепонованими у базі даних GenBank з використанням алгоритму blastn показав 99% схожості з різними штамми *Bacillus simplex*. На основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК представників

різних видів роду *Bacillus* було побудовано дендрограму генетичної подібності, представлена на рис. 3.

На філограмі всі штами виду *B. simplex*, виділені з різних джерел, сформували одну групу, яка достовірно відрізняється від найближчого сусіда *B. megaterium* ATCC 14581T. Необхідно також зауважити, що *B. simplex* ChNPU F1 об'єднався із *B. simplex* S101, виділеним з гірського ґрунту; до складу кластеру штамів виду *B. simplex* входить також *B. muralis*. Сиквенс фрагменту гена 16S рРНК штаму *B. simplex* ChNPU F1 внесено до бази даних GenBank під номером KX349220.

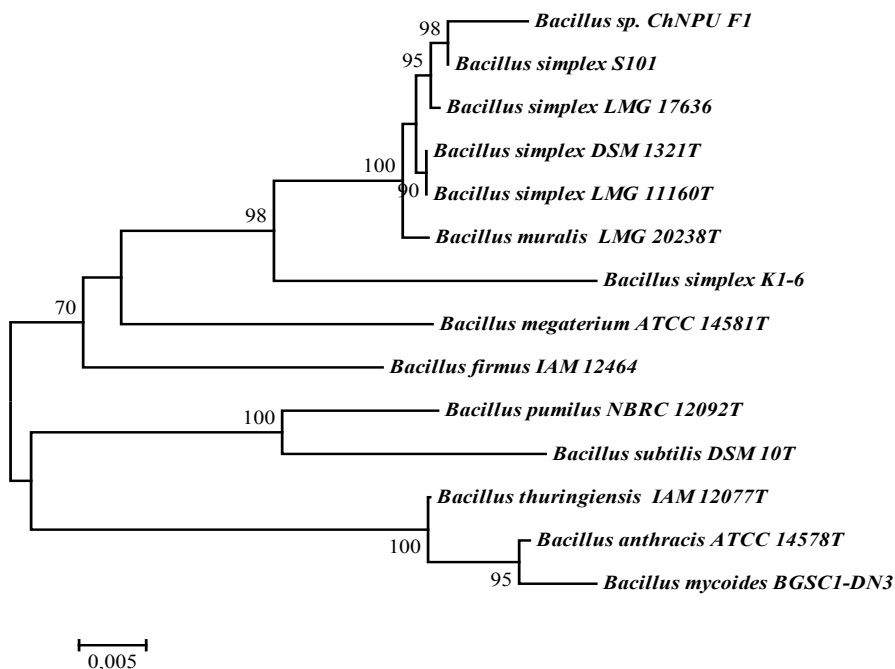


Рис. 3. Філограма генетичної подібності між штамом *Bacillus sp.* ChNPU F1 і представниками роду *Bacillus*, побудована з використанням методу Neighbour-Joining

Штам ChNPU F3 виділяли на МПА, культивування проводили на вісяному агарі. Колонії поверхневі, округлої форми, діаметром 0,5 – 3 мм, жовтувато-сірого кольору з рівними краями. Структура однорідна, профіль опуклий, поверхня гладенька, матова. Консистенція масляниста. На 14-30 добу культивування колонії до 10 мм у діаметрі, мають слабо виражений повітряний міцелій білого кольору.

Бактерії утворюють розгалужений міцелій зі спорами округлої форми, розташованими ланцюжком по 5-10 спор і більше (рис.4, а). Клітини грампозитивні; ендоспори не утворюють; не мають капсули.



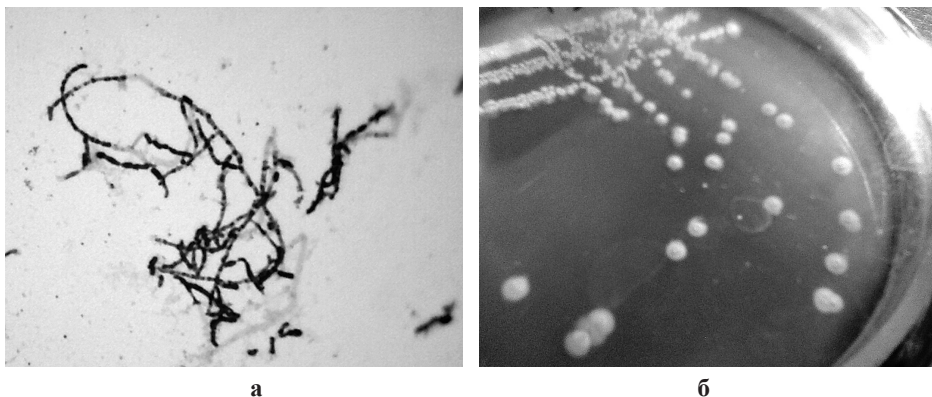


Рис. 4. Штам ChNPU F3: а – клітини при світловій мікроскопії, імерсія, збільшення x1000; б - колонії на вівсяному агарі на 10-у добу культивування

За морфологічними ознаками виділені бактерії можна віднести до актиноміцетів. Спороактиноміцетам для прояву диференціювання, утворення характерних спор і пігментів потрібні спеціальні середовища. Таким середовищем, зокрема, є вівсяний агар [15].

На вівсяному агарі колонії сірого кольору, округлі, діаметром 0,5-1,0 мм (рис.4, б). Краї бахромчасті, поверхня матова, профіль опуклий, консистенція тверда. Повітряний міцелій не виражений. Зворотний бік колоній без відмінних пігментів (жовтувато-сірий колір). Антагоністичні властивості штаму ChNPU F3 щодо штамів ChNPU F1 та ChNPU ZVB1 не виявлено.

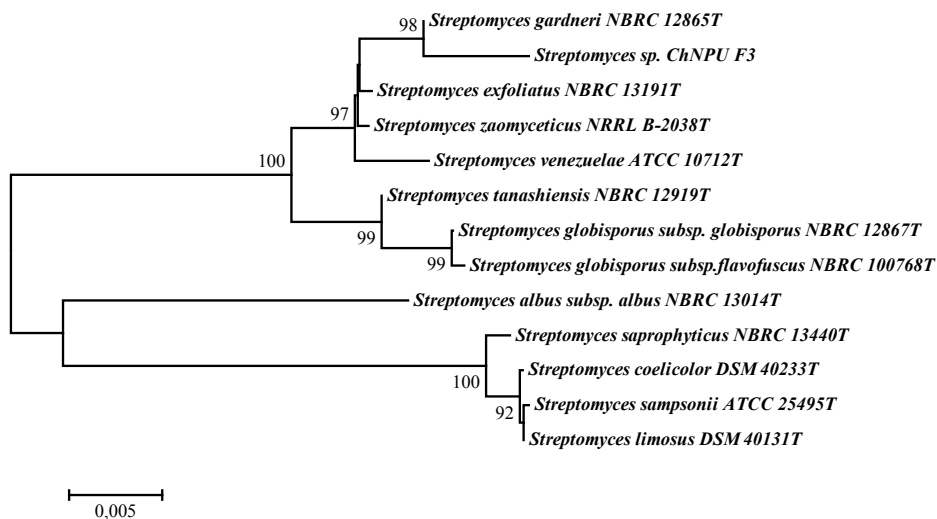
З часом діаметр колоній на вівсяному агарі збільшується (2,5-3,0 мм), форма стає округла з валиком, профіль кратероподібний, повітряний міцелій не виражений. На 10-у добу культивування колонії мають повітряний міцелій білого кольору, слабо виражений (рис.4, б).

Для опису характеру росту у рідких середовищах хемоорганогетеротрофні мікроорганізми вирощують на м'ясо-пептонному бульйоні або на іншому середовищі, яке забезпечує гарний ріст цього мікроорганізму [9]. Так, дослідження росту штаму ChNPU F3 на м'ясо-пептонному бульйоні показало, що розчин прозорий, є незначний пухкий осад; запаху немає; пігментації немає. Бактерії здатні до росту на картопляному агарі, пептонно-дріжджовому агарі, середовищі Чапека та крохмало-аміачному агарі.

Бактерії каталазопозитивні; оксидазонегативні; аероби; цитрат не утилізують; сечовину утилізують; індол не утворюють; сірководень не утворюють; мурашинокисле бродиння не здійснюють; леван не синтезують; крохмаль, жири, казеїн, желатину гідролізують; температурний оптимум 19-33°C, але при 5°C не гинуть і відновлюють ріст за кімнатної температури.

Порівняльний аналіз сиквенсу фрагмента гена 16S рРНК штаму ChNPU F3 (1075 п.н.) із задепонованими у базі даних GenBank виявив 99% схожості з різними представниками роду *Streptomyces*: *S. venezuelae*, *S. zaomyceticus*, *S. gardneri* та ін. Для уточнення філогенетичного поло-

ження досліджуваного штаму була побудована філограма генетичної подібності між видами роду *Streptomyces* на основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК (рис.5).



**Рис.5.** Філогенетичне положення штаму ChNPU F3 та інших представників роду *Streptomyces*, визначене на основі порівняння послідовностей гена 16S рРНК. Дендрограму побудовано за допомогою Neighbour-joining методу

На дендрограмі штам ChNPU F3 сформував одну групу з *S. gardneri*, яка достовірно відокремлена від найближчого кластеру інших представників роду *Streptomyces*. Морфологічні ознаки згідно з Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [15] також вказують на вид *S. gardneri*. Нуклеотидна послідовність фрагмента гена 16S рРНК штаму ChNPU F3 зареєстрована у базі даних GenBank як *S. gardneri* KX349221.

Штам ChNPU ZVB1 виділено на середовищі FWA-Fe (III) цитрат [18]. Ознакою відновлення Fe (III) до Fe (II) є зміна кольору середовища з бурштиново-жовтого на зелене. Колонії штаму ChNPU ZVB1 на щільному середовищі FWA-Fe (III) цитрат за температури 29°C виростають на 7-у добу як за анаеробних, так і за аеробних умов культивування. Колонії поверхневі, бурштинового кольору, діаметром 4 мм, неправильної форми, плескаті, краї хвилясті, поверхня матова, структура крупнозерниста, консистенція м'яка.

На МПА колонії цього штаму виростають при 29°C на 1-у добу за аеробних умов. Колонії поверхневі, округлої форми, жовтувато-сірого кольору, діаметром 1-2 мм, профіль опуклий, краї хвилясті, поверхня блискуча, гладенька, структура однорідна, консистенція м'яка.

Клітини грампозитивні, рухливі, мають форму злегка зігнутих паличок із заокругленими кінцями, довжиною  $4,355 \pm 0,204$  мкм, об'єднуються у довгі зігнуті нитки, оточені чохлам, деякі клітини розтягнуті (рис.6); утворюють центрально розташовані ендоспори; не мають капсули.

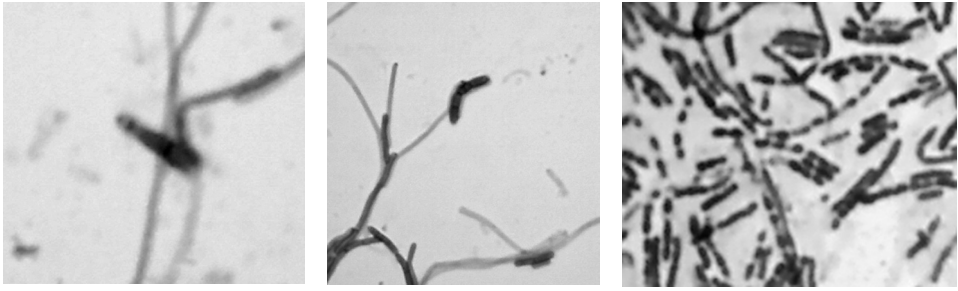


Рис. 6. Мікрофотографії бактерій штаму ChNPU ZVB1 при світловій мікроскопії, імерсія, збільшення x1000

При рості цього штаму на м'ясо-пептонному бульйоні розчин помірно рівномірно каламутний; плівка тонка, добре виражена, гладенька; осад значний, пухкий; є специфічний запах; пігментації немає.

Штам ChNPU ZVB1 здатний до росту на картопляному агарі, пептонно-дріжджовому агарі. Слабкий, плівчастий ріст відмічено на крохмало-аміачному агарі. При культивуванні на середовищі Чапека росту бактерій не відмічено.

Бактерії каталазо- та оксидазопозитивні, факультативні анаероби, глюкозу утилізують як за аеробних умов (без утворення кислоти та газу), так і за анаеробних умов (з утворенням кислоти, але не газу); цитрат, сечовину не утилізують; індол не утворюють, сірководень утворюють; мурашинокисле бродіння не здійснюють; леван синтезують; жири та желатину гідролізують; крохмаль, казеїн не гідролізують; мають фермент фосфоліпазу; температурний оптимум 29-33°C. На маніт-сольовому агарі не ростуть, що можливо пов'язано з чутливістю до високої концентрації NaCl.

За культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними властивостями згідно з Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [14] виділені бактерії можна віднести до родини *Bacillaceae*.

Для подальшої ідентифікації штаму була проведена ампліфікація гена 16S рРНК штаму ChNPU ZVB1 з наступним секвенуванням ПЛР-продукту. Отримані часткові послідовності, загальною довжиною 638 п.н., порівнювали з відомими у базі даних GenBank. Результати аналізу виявили 99% схожості з різними видами роду *Fictibacillus* і *Bacillus*: *F. phosphorivorans*, *F. arsenicus*, *B. nanhaiensis*, *B. barbaricus* та ін. Нуклеотидна послідовність фрагмента гена 16S рРНК штаму ChNPU ZVB1 занесена у базу даних GenBank як *Fictibacillus sp.* KX349222. З метою уточнення філогенетичного положення штаму ChNPU ZVB1 була побудована дендрограма з використанням сиквенсів гена 16S рРНК штаму ChNPU ZVB1 та типових штамів деяких видів *Fictibacillus* і *Bacillus*, довжина яких відповідала секвенуваному фрагменту: до 800 п.н. (рис. 7). Однак необхідно також врахувати, що у результаті нещодавно проведених досліджень деякі види роду *Bacillus*, зокрема *B. arsenicus*, *B. barbaricus*, *B. macauensis*, *B. nanhaiensis*, *B. rigui*, *B. solisalsi* і *B. gelatini*, запропоновано рекласифікувати у рід *Fictibacillus* [16]. На дендрограмі систематичні назви бактерій наведено відповідно до зареєстрованих у GenBank.

На дендрограмі всі види об'єдналися у два великі кластери: перший сформований видами роду *Bacillus*, а до складу іншого входять види роду *Fictibacillus*, у тому числі і штам *Fictibacillus sp.* ChNPU ZVB1. Найближ-



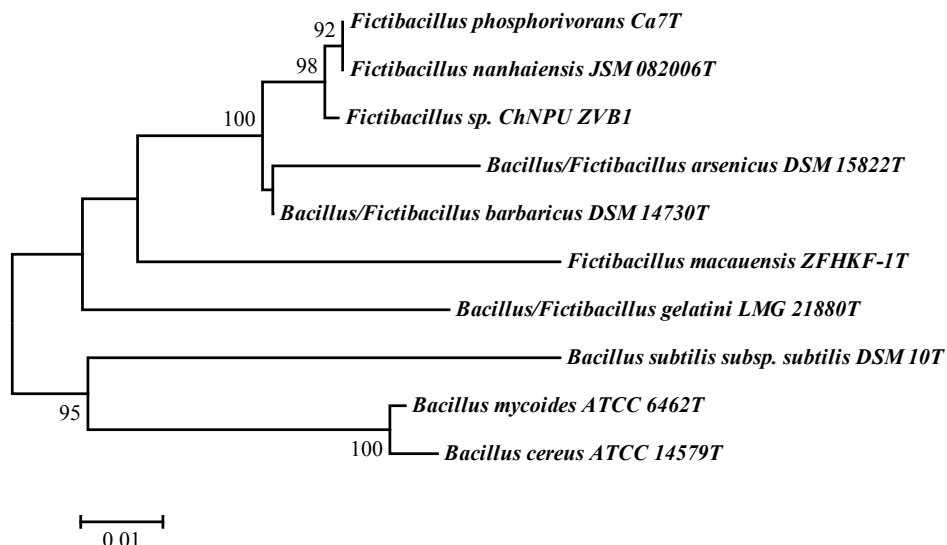


Рис.7. Дендрограма генетичної подібності між видами родів *Fictibacillus* та *Bacillus*, а також *Fictibacillus sp. ChNPU ZVB1*, побудована на основі сиквенсів гена 16S рРНК з використанням Neighbour-joining методу

чими сусідами штаму *Fictibacillus sp. ChNPU ZVB1* виявились типові штами видів *F. phosphorivorans* та *F. nanhaiensis*. Таким чином, на основі проведеного філогенетичного аналізу штаму ChNPU ZVB1 віднесено до роду *Fictibacillus*. Видова ідентифікація штаму потребує більш детального аналізу, зважаючи на частковий сиквенс гена 16S рРНК.

Отже, за рядом мікробіологічних, фізіологічних та генетичних ознак досліджувані бактерії ідентифіковано як *B. simplex*, *S. gardneri* та *Fictibacillus sp.* Виділені штами бактерій використано як тест-культури у наступних дослідженнях антимікробних властивостей нових похідних сечовини на основі пестициду лінурон.

Чутливість виділених штамів до похідних сечовини на основі пестициду лінурон. Встановлено, що серед досліджуваних тест-культур найбільш чутливими щодо похідних є штами ChNPU F1 та ChNPU F3 (табл.1).

**Таблиця 1**  
**Чутливість бактерій, виділених із феросфери металеві конструкції, щодо похідних сечовини на основі пестициду лінурон**

Сполука	Діаметр зони пригнічення росту бактерій, мм ( $\bar{x} \pm SE$ )		
	Штам ChNPU F1	Штам ChNPU F3	Штам ChNPU ZVB1
I	24,0 $\pm$ 0,2	30,0 $\pm$ 0,4	14,0 $\pm$ 0,6
II	20,0 $\pm$ 0,1	31,0 $\pm$ 0,3	—
III	25,0 $\pm$ 0,3	20,0 $\pm$ 0,2	—
IV	19,0 $\pm$ 0,2	15,0 $\pm$ 0,4	11,0 $\pm$ 0,9
V	25,0 $\pm$ 0,2	21,0 $\pm$ 0,3	17,0 $\pm$ 0,8
VI	26,0 $\pm$ 0,3	21,0 $\pm$ 0,2	12,0 $\pm$ 0,7
VII	22,0 $\pm$ 0,3	—	—
VIII	—	—	—
Спирт, 96%	—	—	8,0 $\pm$ 0,4

Примітка: «—» – зона пригнічення росту бактерій відсутня

При цьому найбільші зони пригнічення росту бактерій зафіксовано за дії лінуруну та похідного з фрагментом антипірину (сполука II):  $30,0 \pm 0,4$  мм та  $31,0 \pm 0,3$  мм відповідно, а найменші – за дії похідного з фрагментом антранілової кислоти (сполука IV):  $19,0 \pm 0,2$  мм (штам ChNPU F1) та  $15,0 \pm 0,4$  мм (штам ChNPU F3) (табл.1). На ріст штаму ChNPU F1 не вплинуло лише похідне з фрагментом піперидину (сполука VIII), а штаму ChNPU F3 – похідні з фрагментом піперидину (сполука VIII) та з фрагментом бензиламіну (сполука VII).

Штам ChNPU ZVB1 проявив невисоку чутливість до досліджуваних сполук (табл.1). Так, відмічено незначні зони пригнічення росту бактерій за дії лінуруну ( $14,0 \pm 0,6$  мм) та його похідних з фрагментом антранілової кислоти (сполука IV) ( $11,0 \pm 0,9$  мм), з тiazольним фрагментом (сполука V) ( $17,0 \pm 0,8$  мм) та з фрагментом піридину (сполука VI) ( $12,0 \pm 0,7$  мм). Крім того, бактерії виявили слабку чутливість і до етилового спирту, який був використаний як розчинник похідних.

Таким чином, за комплексом мікробіологічних ознак, фізіолого-біохімічних властивостей та на основі результатів філогенетичного аналізу амоніфікувальні та залізівідновлювальні бактерії, виділені з ферросфери ґрунту, віднесено до видів *B. simplex*, *S. gardneri* та роду *Fictibacillus sp.* Використання виділених штамів як тест-культур при визначенні антибактеріальних властивостей похідних сечовини на основі пестициду лінурон показало високу чутливість бактерій *B. simplex* ChNPU F1 та *S.gardneri* ChNPU F3 і слабку – бактерій *Fictibacillus sp.* ChNPU ZVB1. Для захисту від мікробної корозії перспективною сполукою з антибактеріальними властивостями є похідне з фрагментом антипірину. Зменшення токсичності лінуруну щодо ґрунтових бактерій можливе введенням у його молекулу фрагменту піперидину.

*Автори висловлюють щире вдячність старшому науковому співробітнику відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, д.б.н. Козловій І.П. за науковій консультації та поради при обговоренні матеріалу даної статті.*

**Н.В. Ткачук<sup>1</sup>, Л.Б. Зеленая<sup>2</sup>, В.С. Парминская<sup>1</sup>, В.А. Янченко<sup>1</sup>,  
А.М. Демченко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г.Шевченко,  
ул.Гетьмана Полуботка, 53, Чернигов, 14013, Украина

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ ФЕРРОСФЕРЫ ПОЧВЫ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПЕСТИЦИДУ ЛИУРОН**

### **Резюме**

Из микробного сообщества ферросферы почвы выделено три штамма гетеротрофных аммонифицирующих и железовосстанавливающих бактерий, которые по комплексу микробиологических признаков, физиолого-биохимических свойств и на основании сиквенса гена 16S рPHK (по результатам филогенетического анализа) отнесены к видам *Bacillus simplex*, *Streptomyces gardneri* и роду *Fictibacillus sp.* Нуклеотидные последовательности гена 16S рPHK зарегистрированы нами в базе

данных GenBank. Исследована чувствительность бактерий выделенных штаммов к производным мочевины на основе пестицида линурон. Установлена высокая чувствительность штаммов *B. simplex* ChNPU F1 и *S. gardneri* ChNPU F3, а также слабая штамма *Fictibacillus sp.* ChNPU ZVB1. Выявлено, что для защиты от микробной коррозии перспективным соединением, обладающим антибактериальными свойствами, является производное с фрагментом антипирина. Установлена возможность уменьшения токсичности линурона по отношению к почвенным бактериям путем введения в его молекулу фрагмента пиперидина.

*Ключевые слова:* ферросфера, гетеротрофные аммонифицирующие бактерии, гетеротрофные железовосстанавливающие бактерии, фенотипические признаки, ген 16S рНК, бактерициды, пестицид линурон.

***N.V. Tkachuk<sup>1</sup>, L.B. Zelena<sup>2</sup>, V.S. Parminska<sup>1</sup>, V.O. Yanchenko<sup>1</sup>,  
A.M. Demchenko<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>*Chernihiv National Pedagogical University named after Taras Shevchenko,  
53 Getman Polubotko str., Chernihiv, 14013, Ukraine*

<sup>2</sup>*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Zabolotnogo str., Kyiv, 03143, Ukraine*

#### **IDENTIFICATION OF HETEROTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM SOIL FERROSPHERE AND THEIR SENSITIVITY TO THE PESTICIDE LINURON**

##### Summary

Three strains of heterotrophic ammonifying and iron-reducing bacteria were isolated from soil ferrosphere. They were identified as *Bacillus simplex*, *Streptomyces gardneri* and *Fictibacillus sp.* by the complex of microbiological features, physiological and biochemical properties and on the basis of 16S rRNA gene sequences (phylogenetic analysis). The 16S rRNA gene sequences were registered in GenBank. The sensitivity of isolated bacterial strains to urea derivatives based on the pesticide linuron was studied. It was determined that *B. simplex* ChNPU F1 and *S. gardneri* ChNPU F3 strains were characterized by the high sensitivity to these derivatives but *Fictibacillus sp.* ChNPU ZVB1 – low one. It was defined that the derivative containing antipyrene fragment can be the perspective compound with antibacterial characteristics for protecting against microbial corrosion. It was determined the possibility to decrease linuron toxicity against soil bacteria by insertion of piperidine fragment into its molecule.

*Keywords:* ferrosphere, heterotrophic ammonifying bacteria, heterotrophic iron-reducing bacteria, phenotypic characteristics, 16S rRNA gene, bactericides, pesticide linuron.

1. Абдулина Д.Р., Пуриш Л.М., Иутинская Г.А. Возможность переноса плазмид в бактерии – компоненты сульфидогенного микробного сообщества // Микробиол. журн. – 2013. – 75, №4. – С.23-28.
2. Андреюк К.І., Козлова І.П., Коптева Ж.П., Піляшенко-Новохатний А.І., Заніна В.В., Пуриш Л.М. Микробна корозія підземних споруд. — Київ: Наук. думка, 2005. – 258 с.
3. Дикий И.Л., Холупяк И.Ю., Сидорчук И.И. Микробиология. Руководство к

- лабораторным занятиям. - Х.: Изд. НФаУ «Золотые страницы». – 2002, – 444 с.
4. Курмакова І.М. Наукові основи створення поліциклічних нітрогенвмісних поліфункціональних інгібіторів корозії сталі та механізм їх дії: Автореф. дис. на здобуття наук. ступеня док. техн. наук. – Київ, 2014. – 41 с.
  5. Методы выделения и культивирования // Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. – Пушкино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1978. – С. 7–45.
  6. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. – М.: Мир, 1984. – 264 с.
  7. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://agrosience.com.ua/views/perelik-pest-all>.
  8. Приходько С.В., Курмакова І.М., Третяк О.П. Розвиток корозійного мікробного угруповання ґрунту за наявності Лінурону та його похідних // Мікробіол. журн. – 2007. – **69**, № 6. – С. 26-32.
  9. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Практ. пособие / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. – 215 с.
  10. Смыкун Н.В., Янченко В.А., Третяк А.П., Курмакова И.Н. Влияние некоторых гетероциклических соединений на коррозионно-опасные группы микроорганизмов // Бюлетень Інституту сільськогосподарської мікробіології. – 2000. – №7. – С.87-88.
  11. Смыкун Н.В., Третяк А.П., Курмакова И.Н. Антикоррозионное действие некоторых пестицидов в условиях почвенной коррозии // Мікробіол журн. – 2001, – **63**, №4, – С. 85-90.
  12. Кчачук Н.В., Янченко В.А., Демченко А.М. Біотестування токсичності похідних сечовини на основі пестициду лінурон // Збірник матеріалів науково-практичної конференції «Довкілля і здоров'я» (23 квітня 2015 р., м.Тернопіль). – Тернопіль: ТДМУ, 2015. – С.83-84.
  13. Кчачук Н.В., Парминська В.С., Янченко В.О., Демченко А.М. Антибактеріальні та фітотоксичні властивості похідних сечовини на основі пестициду лінурон // Тези доповідей III Міжнародної науково-практичної конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології», присвяченої 10-річчю кафедри біотехнології Національного авіаційного університету та 175-річчю кафедри фармакології Національного медичного університету ім. О.О.Богомольця, (м.Київ, 22-23 жовтня 2015 р.). – К.: Вид-во «Мегапринт». – С.115-116.
  14. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology // Second edition, Volume three, The Firmicutes / Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman. – New York: Springer, 2009. – 1422 p.
  15. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology // Second edition, Volume five, The Actinobacteria, Part A / Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha E. Trujillo, Ken-ichiro Suzuki, Wolfgang Ludwig and William B. Whitman. – New York: Springer, 2012. – 2083 p.
  16. Glaeser S.P., Dott W., Busse H.J., Kämpfer P. *Fictibacillus phosphorivorans* gen. Nov., sp. Nov. And proposal to reclassify *Bacillus arsenicus*, *Bacillus barbaricus*, *Bacillus macauensis*, *Bacillus nanhaiensis*, *Bacillus rigui*, *Bacillus solisalsi* and *Bacillus*

- gelatini* in the genus *Fictibacillus* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2013. – **63**, N8. – P. 2934-2944.
17. Lane D.G. Nucleic acids techniques in bacterial systematic // Ed. By E. Stackebrandt and M. Goodfellow. – Chichester, United Kingdom: John Wiley, 1991. – P.115–175.
18. Lovley D.R., Phillips E.J.P. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese // Applied and Environmental Microbiology. – 1988. – **54**, N 6. – P. 1472-1480.
19. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Molecular Biology and Evolution. – 2013. – **30**, N12. – P.2725-2729.

Отримано 8.12.2016