

**Ткачук Н.<sup>1</sup>, Зелена Л.<sup>2</sup>**

**ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕТЕРОТРОФНИХ АМОНІФІКУВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ З ФЕРОСФЕРИ ПІДЗЕМНОЇ МЕТАЛЕВОЇ СПОРУДИ**

<sup>1</sup>*Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г.Шевченка*

*вул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернігів 14013, Україна*

*e-mail: smykun\_nata@list.ru*

<sup>2</sup>*Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України*

*вул. Академіка Заболотного, 154, Д03680, Київ, МСП Україна*

*e-mail: zelenalyubov@hotmail.com*

**Тkachuk N.<sup>1</sup>, Zelena L.<sup>2</sup>**

**CHARACTERISTIC OF HETEROTROPHIC AMMONIFYING BACTERIA ISOLATED FROM FERROSPHERE UNDERGROUND OF METAL CONSTRUCTION**

<sup>1</sup>*Chernihiv National Pedagogical University named after Taras Shevchenko*

*53, Polubotko Getman str., Chernihiv 14013, Ukraine*

<sup>2</sup>*Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine*

*154, Zabolotnogo str., Kiev D03680, Ukraine*

Two strains of ammonifying bacteria are isolated from ferrospheres of underground metal structure. They are identified as *Bacillus simplex* and *Streptomyces gardneri* based on research of cultural-morphological, physiological, biochemical and molecular genetic characteristics.

Серед корозійно активних мікроорганізмів ґрунту на особливу увагу заслуговують гетеротрофні амоніфікувальні бактерії, які 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 (Андреюк та ін., 2005). Крім того, у амоніфікувальних бактерій сульфідогенного угруповання виявлено позахромосомні елементи, що може визначати функціонування угруповання у цілому (Абдуліна и др., 2013). Отже, дослідження окремих гетеротрофних представників феросфери ґрунту набуває важливого значення. Тому метою роботи було виділити гетеротрофні амоніфікувальні бактерії з феросфери підземної металевої споруди, дослідити їх культурально-морфологічні, фізіолого-біохімічні та молекулярно-генетичні властивості, встановити таксономічне положення.

Виділення чистих культур бактерій здійснювали з феросфери підземної металевої конструкції методом Коха. Для виділення, культивування та зберігання культур використано м'ясо-пептонний агар (МПА). Температура культивування 29 °С. Дослідження культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей бактерій здійснювали загальновідомими методами (Герхардт и др., 1984). Для встановлення систематичного положення виділених бактерій проводили секвенування гену 16S рРНК, використовуючи методи, описані у роботах (Safronova et al., 2012). Філогенетичний аналіз проводили за допомогою програми MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013).

Нами виділено два штами гетеротрофних бактерій з амоніфікувальною активністю. Бактерії штаму ChNPU F1 виростають на МПА за першу добу. Колонії поверхневі, сірувато-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, опалесцюючі у прохідному світлі через 18 годин культивування. На другу добу колонії непрозорі. На сьому добу колонії стають концентричними, профіль набуває конусоподібного вигляду.

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

Бактерії каталазопозитивні; оксидазонегативні; аероби; цитрат утилізують; індол не утворюють; сірководень не утворюють; казеїн не гідролізують; тест з метиловим червоним негативний; реакція Фогес-Проскауера негативна; температурний оптимум 19–33 °С, але здатні до росту за 5 °С.

За культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними властивостями виділені бактерії можна ідентифікувати до родини *Bacillaceae*. На основі проведеного філогенетичного аналізу виявлено, що найвищий відсоток схожості, 99%, спостерігається між нуклеотидними послідовностями гена 16S рРНК досліджуваного штаму та штамів *Bacillus simplex*; на побу-

дованій дендрограмі подібності між різними представниками роду *Bacillus* штам ChNPU F1 також сформував одну групу з *B. simplex*.

Бактерії штаму ChNPU F3 на МПА виростають на другу добу. Колонії поверхневі, округлої форми, діаметром 0,5 мм (2 доби) та 2–3 мм (4 доби), жовтувато-сірого кольору з рівними краями. Структура однорідна, профіль опуклий, поверхня гладенька, матова. Консистенція м'яка.

Клітини мають форму злегка зігнутих рухливих паличок, є розгалужений міцелій зі спорами округлої форми, розташованими ланцюжком по 50 і більше. Клітини грампозитивні; ендоспори не утворюють; не мають капсули.

За морфологічними ознаками виділені бактерії можна віднести до актиноміцетів, яким для прояву диференціювання, утворення характерних спор і пігментів потрібні спеціальні середовища, зокрема, вівсяний агар (Определитель бактерий Берджи, 1997). Ми виростили штам на вівсяному агарі за температури 29 °С. Колонії виростили на четверту добу, сірого кольору, округлі, діаметром 0,5–1,0 мм. Краї бахромчасті, поверхня матова, профіль опуклий, консистенція тверда. Повітряний міцелій не виражений. Зворотний бік колоній без відмінних пігментів (жовтувато-сірий колір). Довкола колоній спостерігали зони просвітління середовища, що можливо пов'язано з виділенням екзогенної сполуки. Проте антагоністичні властивості цього штаму щодо бактерій штаму ChNPU F1 не виявлено. На сьому добу діаметр колоній 2,5–3,0 мм, форма округла з валиком, профіль кратероподібний, повітряний міцелій не виражений. На десятю добу культивування колонії мають оксамитовий вигляд, повітряний міцелій білого кольору, слабо виражений.

Бактерії каталазопозитивні; оксидазонегативні; аероби; цитрат не утилізують; сечовину утилізують; індол не утворюють; сірководень не утворюють; тест з метиловим червоним негативний; реакція Фогес–Проскауера негативна; леван не синтезують; крохмаль, жири, казеїн, желатину гідролізують; температурний оптимум 19–33 °С, але за 5 °С не гинуть і відновлюють ріст за кімнатної температури.

Порівняльний аналіз сиквенсу гена 16S рРНК штаму ChNPU F3 із задепонованими у базі даних GenBank виявив 99% схожості з різними представниками роду *Streptomyces*. Для уточнення філогенетичного положення досліджуваного штаму була побудована філограма генетичної подібності між видами роду *Streptomyces* на основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК. На дендрограмі штам об'єднався в одну групу з *Streptomyces gardneri*, яка достовірно відокремлена від найближчого кластеру інших представників роду *Streptomyces*.

Отже, за комплексом мікробіологічних ознак, фізіолого-біохімічних властивостей та на основі сиквенсу гена 16S рРНК (за результатами філогенетичного аналізу) бактерії, виділені з феросфери підземної металеві конструкції, ідентифіковано до видів *B. simplex* та *S. gardneri*.