

УДК 579.017.8

Н.Ю. Васильєва, О.Г. Горшкова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна;
тел.: +38(0482)637915, e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ *PSEUDOMONAS MALTOPHILIA* ONU329 – СОРБЕНТА ЙОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ТА ДЕСТРУКТОРА ВУГЛЕВОДНІВ НАФТИ

Мета. Оптимізація складу живильного середовища (ЖС) для культивування бактерій *Pseudomonas maltophilia* ONU329 – сорбентів йонів важких металів та деструкторів вуглеводнів нафти з отриманням максимальної кількості біомаси бактерій і біофлорів. **Методи.** Оптимізацію середовища для культивування бактерій *P. maltophilia* ONU329 проводили за допомогою багатофакторного експерименту з подальшою математичною обробкою даних методом ортогональних латинських квадратів. Культивування бактерій здійснювали на шейкері-інкубаторі New Brunswick Scientific Incubator Shaker INNOVA 43R при 150 об/хв протягом 48 год за температури 29,0 °С. Математичну обробку експериментальних даних проводили шляхом розрахунку ефектів впливу факторів, після проведення досліду, побудованого на підставі дисперсійного аналізу, адаптованого до методу латинських квадратів. **Результати.** Для накопичення максимальної кількості біомаси *P. maltophilia* ONU329 і отримання великої кількості біофлорів у процесі очищення розчинів від йонів важких металів підбрано умови культивування бактерій – склад ЖС: KH_2PO_4 – 1,5 г/л, Na_2HPO_4 – 3,0 г/л, NaCl – 5,0 г/л, NH_4Cl – 1,0 г/л, пептон – 10,0 г/л, глюкоза – 2,0 г/л, дріжджовий екстракт – 5,0 г/л, вода – 1 л; рН 7,2; температура +29 °С. **Висновок.** Результати проведених експериментів з використанням методів оптимізації, заснованих на матриці латинських квадратів, дозволили визначити оптимальні умови для накопичення біомаси штаму *P. maltophilia* ONU329. Отримане живильне середовище сприяє приросту біомаси штаму *P. maltophilia* ONU329 та збільшенню кількості біофлорів у 1,7 рази.

Ключові слова: живильне середовище, оптимізація, метод ортогональних латинських квадратів, *Pseudomonas maltophilia*.

На сьогоднішній день в більшості країн світу із усіх відомих методів очищення води та ґрунту від широкого спектру забруднювачів – йонів важких металів, нафтопродуктів, синтетичних поверхнево-активних речовин, віддають перевагу біологічним методам, які порівняно з механічними, фізичними та хімічними методами є більш ефективними, універсальними і екологічно безпечними за рахунок використання активних непатогенних мікроорганізмів [11, 12].



Перспективним для створення нового ефективного поліфункціонального біопрепарату, призначеного для очистки навколишнього середовища від пелютантів, є штам *Pseudomonas maltophilia* ONU329 – сорбент йонів важких металів [3], деструктор вуглеводнів нафти [4], продуцент біосурфактантів екзогенного типу [5, 6].

Для зменшення часу і витрат, пов'язаних із накопиченням біомаси бактерій, біопрепарат готують у підібраному оптимізованому живильному середовищі у рідинній формі, за спеціальною технологією бактерії іммобілізують на суміші природних сорбентів [9].

При доборі живильних середовищ та оптимізації умов культивування з метою підвищення виходу біомаси широко застосовують методи математичного планування експерименту [2, 8]. Вони дозволяють не тільки одночасно дослідити дію декількох факторів на процес, а й кількісно оцінити ступінь цього впливу.

Метою наших досліджень була оптимізація складу живильного середовища (ЖС) і умов культивування бактерій *Pseudomonas maltophilia* ONU329 – сорбентів йонів важких металів та деструкторів вуглеводнів нафти, для отримання максимальної кількості біомаси бактерій.

Матеріали і методи

В роботі використовували штам *Pseudomonas maltophilia* ONU329, ізолюваний із забрудненого нафтопродуктами морського середовища. Культивування здійснювали на шейкері-інкубаторі New Brunswick Scientific Incubator Shaker INNOVA 43R у флаконах зі 100 мл середовища при 150 об/хв протягом 48 год при 29,0 °С. Засів живильного середовища проводили добовою культурою, що виросла на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) у стаціонарних умовах за температури 30,0 °С. Об'єм посівного матеріалу складав 1,0% до об'єму середовища.

Оптимізацію проводили за допомогою методу ортогональних латинських квадратів [1]. Приріст біомаси бактерій визначали за зміною показника оптичної щільності на спектрофотометрі Specol-10 (Perkin Elmer USA) за довжини хвилі 540 нм. Титр клітин визначали методом серійних розведень з подальшим висівом на щільне середовище МПА [2]. Визначення питомої швидкості росту проводили за стандартними методиками [7, 10].

Математичну обробку експериментальних даних проводили шляхом розрахунку ефектів впливу на показники оптимізації на усіх рівнях досліджених факторів [1]. Результати обробляли статистично.

Біотехнологія очищення води від йонів важких металів передбачає використання іммобілізованих у складі біофлорів бактерій. Суть утворення біофлорів полягає в тому, що під дією перекису водню і хлориду кальцію в однорідній суспензії бактерій утворюються біофлорки. При цьому різко збільшується загальна адсорбційна ємність системи і, відповідно, ефективність очищення води від йонів важких металів.

Для оцінки ефективності використання отриманого біопрепарату у біотехнології очистки води від йонів важких металів використовували сульфат цинку.



Модельний розчин солі цинку з концентрацією 40 мг/л по металу [$C^0(Zn^{2+}) = 40$ мг/л] готували розчиненням у 1 л води 176 мг солі $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Бактерії *Pseudomonas maltophilia* ONU329 нарощували на досліджуваних живильних середовищах. До 15 мл модельного розчину сульфату цинку з вихідною концентрацією по металу 40 мг/л додавали 15 мл суспензії бактерій роду *P. maltophilia* ONU329 у концентрації 10×10^8 клітин/мл та флокулянти (10^{-6} моль/л перекису водню і 0,046 моль/л хлориду кальцію), інтенсивно перемішували впродовж 60 хв на шутелі та 15 хв відстоювали. Після відстоювання і центрифугування проб надосадові розчини аналізували на залишковий вміст у них йонів цинку атомно-абсорбційним методом на полум'яному атомно-абсорбційному спектрофотометрі «Сатурн» у полум'ї суміші «повітря – пропан – бутан». Кількість біофлорів після відстоювання оцінювали за їх об'ємною часткою (об%) відносно 100 мл живильного середовища [13]. Експерименти здійснювали в п'яти повторях. Результати дослідження опрацьовували статистично з використанням програми і «Microsoft Office Excel 2003».

Результати досліджень та їх обговорення

З метою оптимізації умов культивування, отримання максимальної кількості біомаси бактерій і біофлорів, досліджували вплив на інтенсивність росту бактерій *Pseudomonas maltophilia* ONU-329 джерел азоту, вуглецю та співвідношення вуглецю до азоту в середовищі.

Живильні середовища для культивування бактерій містили у своєму складі усі необхідні для росту компоненти. Мінеральна складова середовищ включала неорганічні джерела азоту (NH_4Cl) та фосфору (KH_2PO_4 і Na_2HPO_4).

Як органічну складову живильних середовищ використовували витяжку з торфу, сірчаноокислотний гідролізат рибокісткового борошна та комбінацію пептону, дріжджового екстракту та глюкози. Виходячи з економічної доцільності, здешевлення вартості готової біомаси, середовище 3 містило у два рази менше фосфорних солей та у 5 разів менше глюкози, ніж середовища 1 і 2.

Склад середовищ, використаних у досліді, наведено у таблиці 1. Рівень рН кожного з середовищ був 7,2 і залишався незмінним впродовж культивування.

Під час дослідження також перевіряли вплив дистильованої та водогінної води, що використовували для приготування живильних середовищ, на ростові характеристики штаму *P. maltophilia* ONU-329.

При використанні дистильованої води за результатами дослідження було показано, що при культивуванні штаму *P. maltophilia* ONU-329 на середовищах різного складу бактерії виявили неоднакову ростову активність.

На середовищі 3, яке містило такі органічні сполуки як пептон і глюкоза, спостерігали найбільш інтенсивний ріст штаму *P. maltophilia* ONU-329 (табл. 1). Максимальні показники оптичної щільності на цьому середовищі досягали значення 2,2 D. Чисельність клітин на момент виходу культури на стадію стаціонарного росту досягала значення $(42,0 \pm 9,93) \times 10^8$ КУО/мл. Показник питомої швидкості росту штаму *P. maltophilia* ONU-329 на середовищі 3 склав 0,19 год⁻¹.



Таблиця 1

Склад живильних середовищ (г/л)

Table 1

Composition of nutrient media (g/l)

Компонент	Середовище 1	Середовище 2	Середовище 3
KH_2PO_4	3,0	3,0	1,5
Na_2HPO_4	6,0	6,0	3,0
NaCl	5,0	5,0	5,0
NH_4Cl	1,0	1,0	1,0
Пептон	-	-	10,0
Глюкоза	10,0	10,0	2,0
Сірчаноокислотний гідролізат рибокісткового борошна	-	10,0	-
Витяжка з торфу	10,0	-	-

Також високі показники чисельності клітин *P. maltophilia* ONU-329 ($23,0 \pm 4,96$) $\times 10^8$ КУО/мл спостерігали на середовищі 2, яке містило глюкозу та сірчаноокислотний гідролізат рибокісткового борошна. Показник оптичної щільності на цьому середовищі був дещо меншим і досягав значення 1,9 D. При цьому показник питомої швидкості росту штаму на цьому середовищі був максимальним – 0,29 год⁻¹.

На живильному середовищі 1, яке містило витяжку з торфу в кількості 10,0 г/л і глюкозу в кількості 10 мг/л, відзначався невисокий приріст біомаси бактерій *P. maltophilia* ONU-329, і на перші 48 годин культивування оптична щільність суспензії клітин не перевищувала 1,0 D. Кількість життєздатних клітин також була суттєво меншою – ($36,0 \pm 9,93$) $\times 10^7$ КУО/мл. Значення питомої швидкості росту штаму *P. maltophilia* ONU-329 при використанні середовища 3 також було мінімальним – 0,105 год⁻¹.

Проведений однофакторний дисперсійний аналіз статистично підтвердив існування вірогідного розходження між показниками, що перевіряли. Достовірність підтверджена за допомогою порівняння табличного і розрахованих значень критерію Фішера. У наших випадках дотримується нерівність $F_{\text{табл}} < F_{\text{факт}}$ і визнається статистична значимість різниці між середніми значеннями: $F_{\text{табл}}(3,4) < F_{\text{факт}}(21,4)$ для показника оптичної щільності, та для показника КУО/мл – $F_{\text{табл}}(3,4) < F_{\text{факт}}(81,4)$.

У другій серії дослідів використовували водогінну воду для приготування живильних середовищ. Було показано, що якість води, яку використовували, суттєво не впливає на динаміку росту штаму *P. maltophilia* ONU-329. Результати дослідження наведені у таблиці 2.



**Показники оптичної щільності штаму *Pseudomonas maltophilia* ONU-329
залежно від якості води**

Table 2

**Indices of optical density of strain *Pseudomonas maltophilia* ONU-329
depending on water quality**

Час куль- тивування, години	Дистильована вода			Водогінна вода		
	Середови- ще 1	Середови- ще 2	Середови- ще 3	Середови- ще 1	Середови- ще 2	Середови- ще 3
0	0,11±0,004	0,12±0,004	0,12±0,004	0,11±0,004	0,12±0,004	0,12±0,004
12	0,56±0,02	0,63±0,01	0,80±0,02	0,34±0,01	0,57±0,02	0,75±0,01
24	0,81±0,02	1,12±0,01	1,50±0,01	0,64±0,02	1,06±0,02	1,45±0,05
36	0,94±0,01	1,60±0,01	1,95±0,02	0,82±0,01	1,53±0,02	1,95±0,07
48	1,00±0,10	2,00±0,50	2,20±0,03	0,90±0,01	1,90±0,04	2,10±0,2
60	0,75±0,01	1,80±0,02	2,20±0,04	0,71±0,01	1,80±0,02	2,10±0,02
72	0,62±0,01	1,68±0,01	1,90±0,02	0,62±0,02	1,70±0,02	1,90±0,04

Отримані дані підтверджені результатами однофакторного дисперсійного аналізу: за розрахованими статистичними показниками $F_{\text{факт}} = 0,33$ у порівнянні з $F_{\text{таб}} = 3,4$. Таким чином, приймається нульова гіпотеза, яка свідчить про рівність середніх значень для обох вибірок.

Враховуючи, що і вихід біомаси при культивуванні на водогінній і дистильованій воді практично не відрізнялися між собою, у промислових умовах, виходячи з економічної доцільності, можна використовувати середовища, приготовлені на водогінній воді.

На другому етапі проводили оптимізацію складу живильного середовища для культивування бактерій за допомогою багатофакторного експерименту за методом ортогональних латинських квадратів з подальшою математичною обробкою отриманих даних. Матрицю планування складала за схемою 3_1^3 , яка дозволяла вивчити в умовах одного експерименту взаємний вплив на ріст культури трьох факторів на трьох рівнях. Облік результатів проводили через 24 години культивування.

Як фактори оптимізації використовували пептон, глюкозу та джерело мінерального фосфору у вигляді суміші солей $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ і Na_2HPO_4 .

У експерименті використовували досліджені чинники у кількості:



- пептон – 10,0 г/л, 15,0 г/л, 20,0 г/л (крок – 5,0 г/л);
- глюкоза – 2,0 г/л, 6,0 г/л, 10,0 г/л (крок – 4,0 г/л);
- фосфати (K_2HPO_4 і Na_2HPO_4) – 1,5 г/л : 3,0 г/л; 3,0 г/л : 6,0 г/л; 4,5 г/л : 9,0 г/л (крок – 1,5 г/л та 3,0 г/л).

У таблиці 3 наведені концентрації чинників, які брали у дослід з усіма можливими комбінаціями та показники параметрів оптимізації. В результаті отриманих даних були обчислені ефекти впливу усіх чинників на рівнях, які наведені у табл. 4.

Було з'ясовано, що максимальні ефекти впливу глюкози отриманні за використання концентрації 2,0 г/л. Максимальні ефекти впливу пептону зареєстровані за мінімальної концентрації цього компоненту у живильному середовищі (10,0 г/л). Максимальні ефекти впливу фосфатів відповідають їх концентрації у співвідношенні 1,5 г/л : 3,0 г/л для K_2HPO_4 : Na_2HPO_4 , відповідно.

За вказаних комбінацій компонентів живильних середовищ показник оптичної щільності досягав значення 1,75 D, кількість клітин була максимальною і досягала значення $(96,6 \pm 18,57) \times 10^8$ КУО/мл.

Таблиця 3

Концентрації компонентів живильних середовищ (г/л), які використали у експерименті та показники оптимізації

Table 3

Concentration of the components of nutrient medium (g/l) used in the experiment and indicators of optimization

Варіант досліді	Концентрація компонентів живильних середовищ, г/л			Показники оптимізації	
	Пептон	Глюкоза	K_2HPO_4 : Na_2HPO_4	Оптична щільність	Чисельність клітин, КУО/мл $\times 10^8$
1	10,0	2,0	1,5 : 3,0	1,75	96,6±18,57
2	15,0	2,0	3,0 : 6,0	1,40	15,0±7,45
3	20,0	2,0	4,5 : 9,0	1,50	23,0±4,96
4	10,0	6,0	3,0 : 6,0	1,40	19,0±4,96
5	15,0	6,0	4,5 : 9,0	1,17	12,6±6,25
6	20,0	6,0	1,5 : 3,0	1,50	26,0±2,48
7	10,0	10,0	4,5 : 9,0	0,54	0,2±9,93
8	15,0	10,0	1,5 : 3,0	1,20	16,0±4,96
9	20,0	10,0	3,0 : 6,0	0,85	3,6±9,93



Таблиця 4

**Ефекти впливу компонентів живильних середовищ
та їх концентрацій на показники оптимізації**

Table 4

**Effects of the components of culture media
and their concentrations on optimization performance**

Компоненти середовищ	Концентрація компонентів, г/л	Ефект (оптична щільність)	Ефект (КУО/мл)
Пептон	10	0,22	15,1
	15	0,01	-8,9
	20	-0,03	-5,96
Глюкоза	10	-0,04	-16,9
	6	0,07	-4,3
	2	0,3	21,3
КН ₂ РО ₄ : Na ₂ НРО ₄	1,5:3	0,2	22,7
	3:6	-0,06	-10,9
	4,5:9	-0,02	-11,5

Тобто, оптимальне співвідношення вуглець:азот варіювало від 1:4 до 1:5. Отримані дані можна вважати оптимальними для росту культури.

За результатами першого етапу оптимізації середовище має склад (г/л): КН₂РО₄ – 1,5, Na₂НРО₄ – 3,0, NaCl – 5,0, NH₄Cl – 1,0, пептон – 10,0, глюкоза – 2,0.

З метою подальшого підвищення продуктивності штаму *Pseudomonas maltophilia* ONU329 були проведені експерименти з вивчення впливу дріжджового екстракту на динаміку росту бактерій на живильному середовищі, що містить пептон (10,0 г/л) і глюкозу (2,0 г/л). Отримані результати наведені у таблиці 5.

Як бачимо з наведених у таблиці 5 даних, найкращі результати були отримані при додаванні до середовища дріжджового екстракту у концентрації 5,0 г/л.

Таким чином, після завершення оптимізації з використанням методу ортогональних латинських квадратів та подальшим додатковим визначенням необхідної концентрації дріжджового екстракту, визначили остаточний склад живильного середовища для культивування *Pseudomonas maltophilia* ONU329 наступний (г/л): КН₂РО₄ – 1,5, Na₂НРО₄ – 3,0, NaCl – 5,0, NH₄Cl – 1,0, пептон – 10,0, глюкоза – 2,0, дріжджовий екстракт – 5,0.

Заключним етапом нашої роботи було вивчення впливу складу оптимізованого живильного середовища для культивування *Pseudomonas maltophilia* ONU329 на кількість біофлорів, що утворюються в процесі вилучення важких металів з розчинів із застосуванням мікробної біотехнології. Результати досліджень наведені на рис. 1.



Таблиця 5

Вплив дріжджового екстракту на динаміку росту штаму *Pseudomonas maltophilia* ONU329

Table 5

Effect of yeast extract on growth dynamics of *Pseudomonas maltophilia* ONU329 strain

Концентрація дріжджового екстракту, г/л	Значення показника оптимізації	
	Оптична щільність	Кількість життєздатних клітин (КУО/мл $\times 10^8$)
0	1,85	21,0 \pm 3,96
2,0	1,86	31 \pm 2,48
5,0	1,9	36,0 \pm 9,93

Як видно з наведених даних, кількість біофлоків, що утворюються в процесі очищення розчинів від важких металів, значною мірою залежить від складу живильного середовища, на якому культивували бактерії *Pseudomonas maltophilia* ONU-329. Максимальна кількість біофлоків (23,0 \pm 1,0 об.% та 25,0 \pm 2,0 об.%) утворювалася на середовищах 3 та оптимізованому.

Хімічний аналіз показав, що ступінь вилучення йонів Zn (II) на середовищі 3 та оптимізованому сягала 98,9 \pm 8,77% і 99,9 \pm 5,41%, у той час як на середовищах 1 і 2 – не перевищувала 50,8 \pm 6,36 % і 56,1 \pm 4,11% (рис. 2) [13].

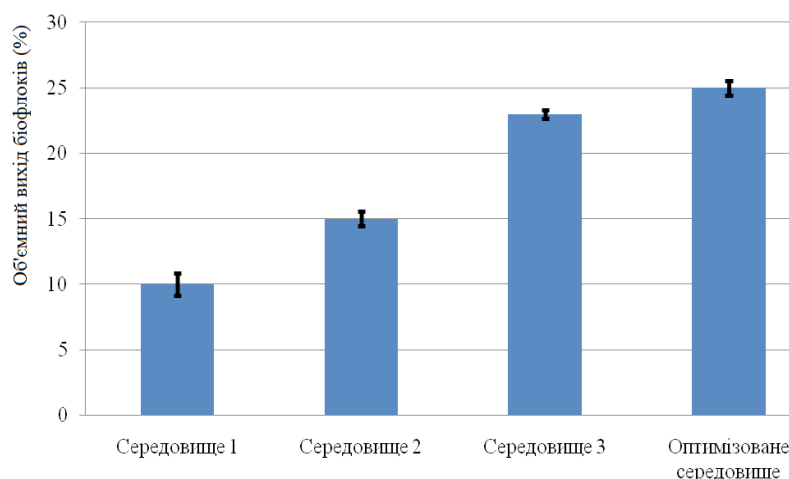


Рис. 1. Вплив складу живильного середовища для культивування *Pseudomonas maltophilia* ONU329 на обсяг біофлоків, що утворюються в процесі вилучення важких металів

Fig. 1. Influence of nutrient medium composition for cultivation of *Pseudomonas maltophilia* ONU329 on the volume of bioflocs produced during the extraction of heavy metals



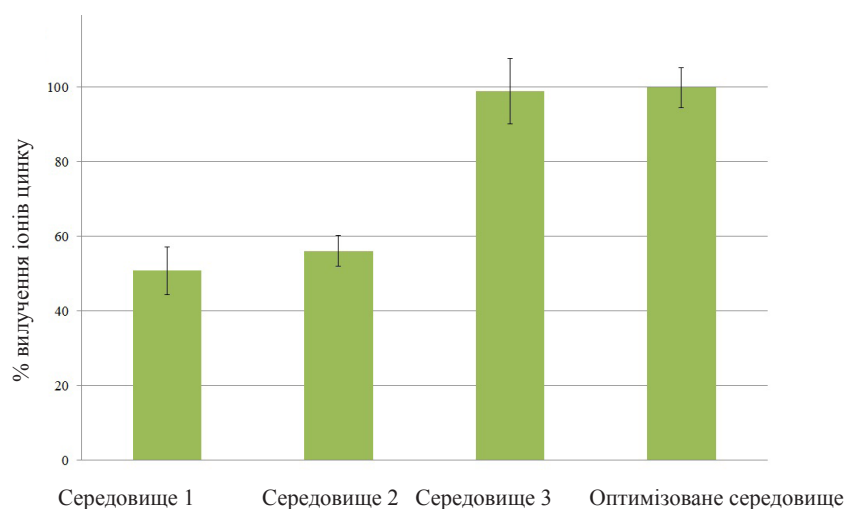


Рис. 2. Ступінь вилучення йонів цинку іммобілізованими клітинами *Pseudomonas maltophilia* ONU329, культивованими на живильних середовищах різного складу

Fig. 2. Extraction degree of zinc ions by immobilized cells of *Pseudomonas maltophilia* ONU 329, cultivated on nutrient media of different composition

Підсумовуючи отримані дані, можна рекомендувати для накопичення максимальної кількості біомаси *P. maltophilia* ONU-329 і отримання великої кількості біофлорів в процесі очищення розчинів від йонів важких металів, такі умови культивування бактерій:

– склад живильного середовища: NaCl – 5,0 г/л; NH₄Cl – 1,0 г/л; KН₂PO₄ – 1,5 г/л; Na₂HPO₄ – 3,0 г/л; пептон – 10,0 г/л; глюкоза – 2,0 г/л; дріжджовий екстракт – 5,0 г/л, вода дистильована або водопровідна – 1 л; рН = 7,2; температура культивування 29 °С.

Н.Ю. Васильєва, Е.Г. Горшкова

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

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА *PSEUDOMONAS MALTOPHILIA* ONU-329 – СОРБЕНТА ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ДЕСТРУКТОРА УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ

Реферат

Цель. Оптимизация состава питательной среды (ПС) для культивирования бактерий *Pseudomonas maltophilia* ONU-329 – сорбентов ионов тяжелых металлов и деструкторов углеводородов нефти и получения максимального количества биомассы бактерий и биофлор. **Методы.** Оптимизацию ПС для культивирования бактерий *P. maltophilia* ONU-329 проводили с помощью многофакторного эксперимента с последующей математической обработкой данных



методом ортогональных латинских квадратов. Культивирование бактерий осуществляли в инкубаторе-шейкере New Brunswick Scientific Incubator Shaker INNOVA 43R при 150 об/мин в течение 48 часов при температуре +29,0 °C. Математическую обработку экспериментальных данных проводили путем расчета эффектов воздействия факторов после проведения дисперсионного анализа, адаптированного к методу латинских квадратов. **Результаты.** Для накопления максимального количества биомассы *P. maltophilia* ONU-329 и получения большого количества биофлоков в процессе очистки растворов от ионов тяжелых металлов подобраны условия культивирования бактерий – состав ПС: KH_2PO_4 – 1,5 г/л, Na_2HPO_4 – 3,0 г/л, NaCl – 5,0 г/л, NH_4Cl – 1,0 г/л, пептон – 10,0 г/л, глюкоза – 2,0 г/л, дрожжевой экстракт – 5,0 г/л, вода – 1 л; рН 7,2; температура +29 °C. **Вывод.** Результаты проведенных экспериментов с использованием методов оптимизации, основанных на матрице латинских квадратов, позволили определить оптимальные условия для накопления биомассы штамма *P. maltophilia* ONU-329. Полученная питательная среда способствует приросту биомассы штамма *P. maltophilia* ONU-329 и увеличению количества биофлоков в 1,7 раза.

Ключевые слова: питательная среда, оптимизация, метод ортогональных латинских квадратов, *Pseudomonas maltophilia*.

N.Yu. Vasylieva, O.G. Gorshkova

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

OPTIMIZATION OF THE NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATION OF *PSEUDOMONAS MALTOPHILIA* ONU329 STRAIN – SORBENT OF HEAVY METALS IONS AND DESTRUCTOR OF OIL HYDROCARBONS

Summary

Aim. Optimization of the nutrient medium (NM) for cultivation of *Pseudomonas maltophilia* ONU-329 strain – sorbents of heavy metals ions and destructors of oil hydrocarbons to obtain the maximum amount of biomass of bacteria and bioflocules. **Methods.** Optimization of the NM for the cultivation of bacteria *P. maltophilia* ONU-329 was performed using multifactorial experiment with subsequent mathematical processing of the data by the method of orthogonal Latin squares. Cultivation of bacteria was carried out in incubator shaker New Brunswick Scientific INNOVA 43R Incubator Shaker at 150 rpm for 48 hours at temperature +29.0 °C. Mathematical processing of experimental data was performed by calculating the effects of impact factors, after conducting the analysis of variance, adapted to the method of Latin squares. **Results.** To accumulate the maximum amount of biomass of *P. maltophilia* ONU-329 and a large number of bioflocules in the process of purification from heavy metals there were selected the conditions of cultivation of bacteria – composition NM: KH_2PO_4 – 1.5 g/l, Na_2HPO_4 – 3.0 g/l, NaCl – 5.0 g/l, NH_4Cl – 1.0 g/l, peptone – 10.0 g/l, glucose 2.0 g/l, yeast extract – 5.0 g/l, distilled water or water, 1 litre; pH 7.2; temperature +29 °C. **Conclusion.** The experimental results on the study of indicators of optical density and number of colonies grown on medium MPA, using the methods of optimiza-



tion based of the matrix of Latin squares, allowed to determine the best conditions for the accumulation of biomass of *P. maltophilia* ONU-329 strain. The obtained culture medium contributes to the increase of biomass of *P. maltophilia* ONU-329 strain and increases the number of bioflocules in 1.7 times.

Key words: nutrient medium, optimization, Latin squares, *Pseudomonas maltophilia*.

Список використаної літератури

1. Бирюков В.В., Кантере В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. – М.: Наука, 1985. – 296 с.
2. Васильєва Н.Ю., Гудзенко Т.В., Панченко М.М., Іваниця В.О. Оптимізація складу поживного середовища для ентомопатогенних бактерій штаму *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4(20). – С. 52–63.
3. Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Конуп І.П., Бухтіяров А.Є., Захарія О.М., Лісютин Г.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О. Вилучення міді (II) та нікелю (II) із концентрованих водних розчинів глиною, хітозаном та іммобілізованими мікроорганізмами // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4. – С. 36–43.
4. Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Лісютин Г.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О. Нафтоокиснювальна активність деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4. – С. 72–80.
5. Гудзенко Т.В., Іваниця В.О., Волювач О.В., Горшкова О.Г., Беляєва Т.О., Конуп І.П., Дімова М.І. Вплив поживного середовища на здатність нафтоокиснювальних бактерій роду *Pseudomonas* продукувати біосурфактанти // Scientific Journal “ScienceRise” – 2014, № 5/1(5). – С. 7–11.
6. Гудзенко Т.В., Горшкова О.Г., Беляєва Т.О., Ракітська С.І., Лісютин Г.В., Іваниця В.О. Біотехнологія оздоровлення морського середовища з використанням іммобілізованих мікроорганізмів / Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія. Біологія – 2015, № 3-4 (64). – С. 146–149.
7. Ждан-Пушкина С.М. Основы роста культур микроорганизмов: Учеб. пособие / Под ред. В.П. Гончаровой.— Л.: Лен. ун-т, 1983. — 188 с.
8. Максимов В.Н., Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н. Оптимизация состава питательной среды методом планирования эксперимента // Практикум по микробиологии. – М., 1976. – С. 172–181.
9. Нгуен Виет Тиен. Гетеротрофные бактерии техногенных субстратов как основа биопрепаратов-деструкторов нефтяных углеводородов и поверхностно-активных веществ: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ульяновск, 2013. – 174 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Наука, – 1978. – 333 с.



11. Mougín C., Boukcim H., Jolivalt C. *Advances in Applied Bioremediation (Soil Biology)*. – Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. 2009. – 17. – P. 123–149.
12. Obayori O.S., Ilori M.O., Obayori O. S., Adebuseye S.A., Oyetibo G.O., Omotayo A.E. Amund Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas sp. strain* LP1 // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2009. – 25, № 9. – P. 1615–1623.
13. Патент України № 90119, МПК С02F 1/24. Спосіб мікробіологічного очищення води від іонів цинку / Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Горшкова О.Г., Беляєва Т.О., Конуп І.П., Баранов О.О. (Україна). – N 90119; заявл. 24.12.2013; опубл. 12.05.2014, Бюл. N 9.

References

1. Biryukov VV, Kanter VM. **Optimization of periodic process of microbiological synthesis**. Moscow: Nauka, 1985. 296 p.
2. Vasylieva NYu, Gudzenko TV, Panchenko MM, Ivanytsia VO. Optimser warehouse posevnogo protection for entomopatogenic the staph bacteria *Bacillus thuringiensis* ONU 15. *Microbiology and biotechnology*. 2012;4(20):52–63.
3. Gudzenko TV, Voliuvach OV, Belyaeva TO, Konup IP., Bukhtiyarov AE, Zachariah AM., Lisyutin GV, Gorshkova EG, Ivanytsia VO. Extraction of copper (II) and nickel (II) from concentrated aqueous solutions by clay, chitosan and immobilized microorganisms. *Microbiology and biotechnology*. 2012;(4):36-43.
4. Gudzenko TV. Voliuvach OV, Belyaeva TO, Puzyreva IV., Lisyutin GV, Gorshkova OG, Ivanytsia VO. Oil oxidative activity of some strains of bacteria of *Pseudomonas* genus. *Microbiology&Biotechnology*. 2013;(4):72–80.
5. Gudzenko TV, Ivanytsia VO., Voliuvach A.V., Gorshkova OG, Belyaeva TO, Konup IP, Dimova M. Influence of nutrient medium on the ability natto kinase bacteria of the genus *Pseudomonas* to produce biosurfactant. *Scientific Journal "ScienceRise"* 2014;(5):7-11.
6. Gudzenko TV, Gorshkova OG, Belyaeva TO, Rakitskaya SI., Lisyutin GV, Ivanytsia VO. Biotechnology for the improvement of the marine environment with the use of immobilized microorganisms. *Scientific notes of Ternopil national pedagogical University named after Volodymyr Hnatiuk. Series. Biology*. 2015;(3-4):146-149.
7. Zhdan-Pushkina SM. *Fundamentals of growth of cultures of microorganisms: Proc. the manual*. Leningrad: Len. University, 1983. 188 p.
8. Maksimov VN, Pimenova MN, Grechushkina NN. Optimization of the nutrient medium by the method of experiment planning. *Workshop on Microbiology*. Moscow: Nauka, 1976: 172-181.
9. Nguyen Viet Tien. Heterotrophic bacteria technogenic substrates as a base of biopreparation-destroyer of oil hydrocarbons and surfactants. **PhD thesis**, Ulyanovsk, 2013. 174 p.
10. Pert SJ. *Fundamentals of cultivation of microorganisms and cells*. Moscow: Science, 1978. 333 p.



11. Mougин C, Boukcim H, Jolivalt C. Advances in Applied Bioremediation (Soil Biology). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. 2009;(17):123-149.
12. Obayori OS, Ilori MO, Obayori OS, Adebusoye SA, Oyetibo GO, Omotayo AE. Amund Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas sp. strain* LP1. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009;(25):1615-1623.
13. Patent of Ukraine 90119/14, MBI C02F 1/24. Method for microbiological purification of water from ions of zinc. Ivanytsia VO, Gudzenko TV, Voliuvach OV, Gorshkova OG, Belyaeva TO, Konup IP, Baranov OO. (UA). - N 90119; zayavl. 24.12.2013; opubl. 12.05.2014, Byul. N 9.

Стаття надійшла до редакції 24.02.2016 р.

