

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

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

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

№ 2(49)  
2020

Одеса  
ОНУ  
2020

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

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

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

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

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

**Відповідно до наказу МОН України № 1301 від 15.10.2019 р.  
входить до Переліку наукових фахових видань України (категорія «Б»).**

**Видання реферується та індексується в наукометричних базах 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.urau.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Research Bib, Наукова електронна бібліотека e-LIBRARY, IBI Factor**

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

© Одеський національний університет  
імені І. І. Мечникова, 2020

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

**EDITOR-IN-CHIEF**

V. O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

**CO-EDITOR-IN-CHIEF**

T. O. Filipova (Odesa, Ukraine)

**EXECUTIVE SECRETARY**

T. V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

**EDITORIAL BOARD MEMBERS**

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

**Scientific editor V. O. Ivanytsia**

*Accepted for publishing articles are reviewed*

Approved for publishing by Academic Council  
of Odesa National Mechnykov University

**According to the order of the Ministry of Education and Science of Ukraine № 1301 from 15.10.2019 it is included in the List of scientific professional editions of Ukraine (category "B").**

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

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

Editors: T. V. Ivanytsia, I. V. Raiko

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

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

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

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

© Odesa National Mechnykov  
University, 2020

## ЗМІСТ

### ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

<b>Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова</b> БІОТРАНСФОРМАЦІЯ КСЕНОБІОТИКІВ МІКРОБІОТОЮ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ ТА ЇЇ НАСЛІДКИ ДЛЯ ЛЮДИНИ .....	6
---	---

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

<b>Н.А. Ямборко, Г.О. Іутинська, О.М. Дуган, Д.О. Фарфоломєєва</b> <i>STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA</i> ІМВ В-7288 ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ ДЕСТРУКТОР КОМПЛЕКСУ ІЗОМЕРІВ ГЕКСАХЛОРЦИКЛОГЕКСАНУ В АЕРОБНИХ УМОВАХ .....	24
---	----

<b>Н.В. Коротаєва, Н.В. Ліманська, І.В. Страшнова, В.О. Іваниця</b> ВПЛИВ БАКТЕРІЙ <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ONU87 НА РОЗВИТОК БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ НА РОСЛИНАХ ВИНОГРАДУ .....	33
---	----

<b>Л.О. Максименко</b> МОРФОЛОГО-СТРУКТУРНІ, КІЛЕРНІ ТА СЕРОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНИХ БАКТЕРІОЦИНІВ <i>PESTOBACTERIUM</i> <i>CAROTOVORUM</i> SUBSP. <i>CAROTOVORUM</i> ТА ЇХ СПОРІДНЕНІСТЬ З БАКТЕРІОФАГОМ ZF40 .....	44
---	----

<b>Н.Ю. Васильєва, І.В. Страшнова, О.В. Басюл, І.О. Ковтун, В.О. Іваниця</b> СТІЙКІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ КОКІВ, ІЗОЛЬОВАНИХ З ЧОРНОМОРСЬКИХ ВОДОРОСТЕЙ І МІДІЙ .....	57
--	----

<b>Н.В. Титаренко, Н.Л. Теслюк</b> УДОСКОНАЛЕННЯ ПРОЦЕСІВ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ОЖИНИ ЗВИЧАЙНОЇ <i>RUBUS CAESIUS</i> L. СОРТУ ТОРНФРІ .....	72
---	----

### ЮВІЛЕЇ І ДАТИ

ДО 70-РІЧЧЯ ВІД ДНЯ НАРОДЖЕННЯ ФІЛПОВОЇ ТЕТЯНИ ОЛЕГІВНИ .....	85
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ .....	88

## CONTENTS

### OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

**B.N. Galkin, T.O. Filipova**

BIOTRANSFORMATION OF THE XENOBIOTICS BY MICROBIOTA OF THE GASTROINTESTINAL TRACT AND ITS CONSEQUENCES FOR HUMANS .....	6
--	---

### EXPERIMENTAL WORKS

**N.A. Yamborko, G.O. Iutynska, A.M. Dugan, D.O. Farfolameieva**

<i>STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA</i> IMV B-7288 AS THE PROMISING DESTRUCTOR OF HEXACHLOROCYCLOHEXANE ISOMERS COMPLEX AT AEROBIC CONDITIONS .....	24
---	----

**N.V. Korotaeva, N.V. Limanska, I.V. Strashnova, V.O. Ivanytsia**

EFFECT OF <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ONU87 ON THE DEVELOPMENT OF CROWN GALL IN GRAPE .....	33
--	----

**L.O. Maksymenko**

MORPHO-STRUCTURAL, KILLER AND SEROLOGICAL PROPERTIES OF MACROMOLECULAR BACTERIOCINS OF <i>PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM</i> SUBSP. <i>CAROTOVORUM</i> AND THEIR RELATEDNESS TO BACTERIOPHAGE ZF40 .....	44
--	----

**N.Yu. Vasylieva, I.V. Strashnova, O. V. Basiul, I.O. Kovtun, V. Ivanytsia**

RESISTANCE OF LACTIC COCCI ISOLATED FROM BLACK SEA ALGAE AND MUSSELS TO ANTIBIOTIC .....	57
--	----

**N. Tytarenko, N. Tesliuk**

IMPROVEMENT OF THE PROCESSES OF MICROCLONAL REPRODUCTION OF BLACKBERRY <i>RUBUS CAESIUS</i> L. THORNFREE .....	72
--	----

### ANNIVERSARIES AND DATES

TO THE 70TH ANNIVERSARY OF FILIPOVA TATIANA OLEHIVNA BIRTH .....	85
--	----

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS .....	88
------------------------------------	----

**Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,  
тел.: +380482635761 e-mail: bgalkin@ukr.net

## **БІОТРАНСФОРМАЦІЯ КСЕНОБІОТИКІВ МІКРОБІОТОЮ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ ТА ЇЇ НАСЛІДКИ ДЛЯ ЛЮДИНИ**

*В огляді представлені дані сучасних джерел літератури про біотрансформацію ксенобіотиків мікробіотою шлунково-кишкового тракту людини. Приведені основні ензими, які беруть участь у біотрансформації. Показана роль біотрансформації ензимів мікробіоти у активації та пригнічення лікарських засобів, детоксикації та токсикації чужорідних сполук та важких металів.*

*Ключові слова: кишкова мікробіота, біотрансформація ксенобіотиків, ензими, барвники, важкі метали, лікарські препарати*

За останні кілька десятиліть вивчення біотрансформації ксенобіотиків кишковою мікробіотою, показало, що останні мають більшу кількість метаболічних шляхів, ніж сам організм. Відмінності трансформації різних сполук в організмі людини та бактерій ґрунтуються не тільки на більшій різноманітності ензимів, присутніх у складному і мінливому співтоваристві мікроорганізмів, але також і в зовнішньому середовищі, яке формувало умови для виникнення певних механізмів у бактерій. Якщо метаболізм ксенобіотиків у людини розвивався, щоб полегшити безпосереднє виведення цих сполук, то бактеріальна трансформація чужорідних сполук і їх метаболітів використовується для синтезу поживних речовин і виробництва енергії. Бактеріальний метаболізм може регулювати метаболізм людини та змінювати фармакокінетичні, фармакодинамічні властивості ксенобіотиків і пов'язаних з ними метаболітів.

Діапазон ксенобіотиків, які трансформуються мікробіотою кишечника вражає. Кишкові мікроорганізми трансформують багато класів поживних речовин, в тому числі складні поліцукриди, білки, ліпіди і фітохімічні сполуки. Ці метаболічні реакції дуже корисні для організму, також вони впливають на сприйнятливості людей до хвороб. Кишкова мікробіота також здатна трансформувати промислові хімікати і забруднювальні речовини, змінюючи їх токсичність і тривалість перебування в організмі. Аналогічним чином, бактеріальні перетворення лікарських препаратів можуть змінити їх фармакокінетичні властивості та брати участь у активації проліків і це може приводити до



небажаних побічних ефектів або втрати ефективності лікарських препаратів [1].

Більшість реакцій біотрансформації ксенобіотиків в організмі людини відбувається у шлунково-кишковому тракті. Відділи шлунково-кишкового тракту характеризуються різною фізіологією епітеліальних клітин, рН, рівнями кисню і вмістом поживних речовин, що зумовлює різні умови середовища існування для мікроорганізмів і впливає на типи метаболічних процесів, які в цих відділах відбуваються [2, 3]. Сотні різних видів мікроорганізмів колонізують епітелій кишківника. Хоча обов'язкові анаероби, такі як *Firmicutes* і *Bacteroidetes*, зазвичай є переважальними мікроорганізмами у них присутня індивідуальна мінливість у складі мікробіотної спільноти [4].

Різні сполуки, які потрапляють через шлунково-кишковий тракт до тонкого кишечника, модифікуються травними ензимами та поглинаються тканинами організму. Ксенобіотики, які легко адсорбуються, проходять між або через кишкові епітеліальні клітини, можуть бути метаболізовані ензимами людини перед транспортуванням в печінку через портальну вену. Після контакту з великою кількістю метаболічних ензимів печінки, ксенобіотики і їх метаболіти попадають в тканини організму та можуть викликати різні ушкодження. Навпаки, сполуки, які вводяться внутрішньовенно негайно попадають у системний кровотік та обходять метаболічні перетворення у печінці.

Чужорідні сполуки в циркуляційній системі в кінцевому підсумку додатково метаболізуються та виводяться з організму, або через жовчний канал назад в просвіт кишечника, або через нирки. Метаболіти, повернуті в кишковий просвіт, можуть продовжувати рух в товсту кишку, де в кінцевому підсумку вони будуть виявлені в фекаліях, або можуть бути реабсорбовані через клітини кишківника, потрапляючи в систему ентеропатичної циркуляції.

Таким чином, ксенобіотики можуть зустрічатися з кишковою мікробіотою шляхом проходження різних маршрутів. На відміну від сполук, які абсорбуються в тонкому кишечнику, погано всмоктувані ксенобіотики продовжують проникати з тонкої кишки в товсту кишку і можуть трансформуватися мікроорганізмами, що живуть в цьому відділі кишкового тракту. Легко абсорбовані сполуки та речовини, що вводяться іншими шляхами (наприклад, внутрішньовенна ін'єкція), також можуть трансформуватися кишковою мікробіотою через жовчну екскрецію. Продукти бактеріального метаболізму в кишечнику можуть поглинатися в організмі люди і циркулювати систематично, або взаємодіяти локально з епітеліальними клітинами, що вистилають шлунково-кишковий тракт. В кінцевому рахунку, ці бактеріальні метаболіти виділяються з фекаліями або фільтруються нирками і видаляються з сечею [5].

На відміну від мікроорганізмів навколишнього середовища, мікроорганізми шлунково-кишкового тракту метаболізують ксенобіотики тільки шляхами гідролізу та відновлення [6]. У мікроорганізмів навколишнього середовища багатший спектр шляхів метаболізму чужорідних сполук, якими користуються аероби та анаероби. Найчастіше це призводить до повної біодеградації, чи мінералізації ксенобіотика [7]. В організмі людини ферментні процеси кишкової мікробіоти відрізняються від ензимних процесів мікроорганізмів



навколишнього середовища. Метаболізм чужорідних сполук протікає за допомогою окиснювальних та кон'югативних ензимів.

За допомогою молекулярно-біологічних досліджень були секвеновані гени, які кодують інформацію про ензими мікроорганізмів кишково-шлункового тракту [8–11]. Метагеномні аналізи показали, що ензими мікробіоти кишечника відносяться до найбільш важливих класів ензимів. Реакції біодеградації ксенобіотиків можуть бути виконані кишковими мікроорганізмами декількох різних філогенетичних груп. Здатність до метаболізму може передаватися між бактеріями механізмами горизонтального переносу генів. Все це ускладнює виявлення метаболічних можливостей бактерій шляхом тільки філогенетичного аналізу. Необхідно в доповнення до молекулярно-біологічних методів використовувати інші підходи, такі як, культури тканин та повних біохімічних характеристик ферментів кишкової мікробіоти.

Тому метою даного огляду було показати, як бактеріальні ензими кишково-шлункового тракту людини впливають на його гомеостаз.

### Метаболізм ксенобіотиків тканинами та бактеріями шлунково-кишкового тракту

Процеси метаболізму ксенобіотиків трансформують неполярні сполуки в гідрофільні для їх подальшого полегшення екскреції з організму. Цей процес протікає в два етапи: приєднання полярної функціональної групи («фаза I») і кон'югація цієї групи з більш полярним метаболітом («фаза II»). Ензими фази I каталізують окисні, відновні або гідролітичні реакції для отримання гідроксильних груп, епоксидів, тіолів і амінів. Найбільший клас ферментів фази I це цитохром P-450, але карбоксиестерази і флавінмонооксигенази також беруть активну участь у метаболізмі ксенобіотиків [5]. Ензими трансферази переважають у II фазі метаболізму, додаючи аглікони, такі як, глюкуроніли, метили, ацетили, сульфоніли і глутатіоніли [12] (рис.1). Поліморфізм генів, відповідальних за метаболізм ксенобіотиків, зумовлений індивідуальною реакцією організму на вживання певної їжі або при введенні лікарських речовин.

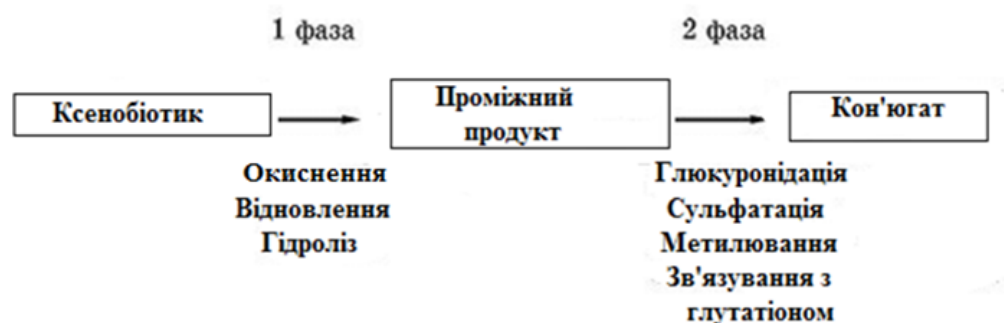


Рис. 1. Дві фази метаболізму ксенобіотиків [5, 12]

Fig. 1. Two phases of xenobiotic metabolism [5, 12]



**Гідролази.** Гідролазні ензимні реакції необхідні для гідролізу різних органічних сполук у менші сполуки. Ці ензими є як у людському організмі, так і у кишкової мікробіоти. Ензими гідролази каталізують додавання молекули води до субстрату, після чого відбувається розщеплення зв'язків у молекулі. Більшість гідролаз в шлунково-кишковому тракті представлені протеазами, глікозидазами і сульфатазами ( рис. 2).

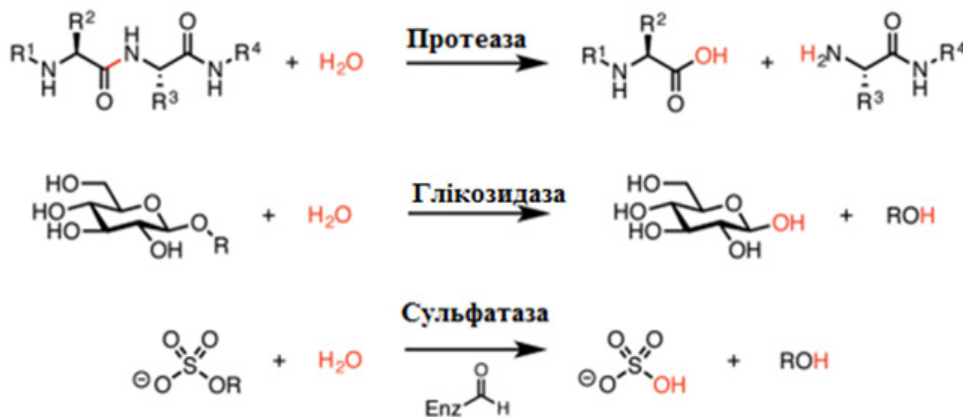


Рис. 2. Бактеріальні гідролази кишково-шлункового тракту [1]

Fig. 2. Bacterial hydrolases of the gastrointestinal tract [1]

У бактерій ці ензими представлені у ширшому спектрі, ніж у людині. Протеази, розщеплюють пептидні зв'язки, що зв'язують амінокислоти в поліпептидні ланцюги. У тонкому кишечнику переважають підшлункові серинові протеази, в товстому кишечнику міститься багато мікробних цистеїн- і металопротеаз [13] з різною субстратною специфічністю і потенційно різними клінічними наслідками [14]. Глікозидази гідролізують глікозидні ланцюги з використанням карбонових кислот і молекул води, при цьому вивільняються вільні цукри [15]. Ці ферменти обробляють величезну кількість глікокон'югатів і олігоцукридів, і широко представлені у кишкових бактерій [16]. Сульфатази, які також широко представлені у бактерій, гідролізують складні етери сульфату, що генеруються в процесі метаболізму у II фазі, використовуючи незвичайну амінокислоту формілгліцин [17]. Вважається, що гідратна форма цього залишку схильна до переетерифікації субстратним сульфатним етером для отримання тетраедричної проміжної сполуки, яка розривається, щоб вивільнити сульфат і відтворений альдегід [18].

Гідролітичні реакції змінюють фізичні властивості, та активності ксенобіотиків і їх метаболітів. Трансформація глюкуроніду в просвіті кишечника зазвичай супроводжується зменшенням його полярності і може дозволити клітинам-людини реабсорбувати цю молекулу і тим самим збільшити час його перебування в організмі. Гідроліз часто є необхідною умовою для подальших перетворень, таких як ферментація цукрів, що виділяються з поліцукридів [19].

**Ліази.** Ензими ліази руйнують зв'язки C-C, C-X (де X = O, N, S, P або галогеніди). Бактеріальні ліази поліцукридів метаболізують поліцукриди які містять глікозидний зв'язок в  $\beta$ -положенні щодо карбонової кислоти (наприклад, альгінат, пектин, хондроїтин і гепаран). Присутність карбоксилату дозволяє виділити протон і подальше  $\beta$ -елімінування, щоб отримати  $\beta$ -ненасичений цукор та напівацеталь [8]. У мікробіомі кишечника людини знайдено 5000 ліаз, які метаболізують поліцукриди [8], що дозволяє провести величезну кількість реакцій (рис. 3). Отримані моноцукри використовуються мікроорганізмами для обміну речовин та енергії.

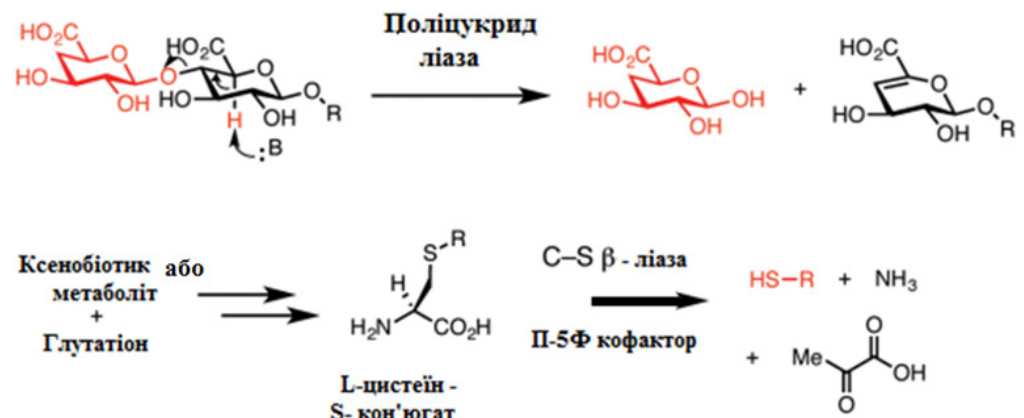


Рис. 3. Бактеріальні ліази кишково-шлункового тракту [1]

Fig. 3. Bacterial lyases of the gastrointestinal tract [1]

Знайдені бактеріальні C-S  $\beta$ -ліази, які розщеплюють зв'язки C-S, як в сполуках компонентів харчування, так і в цистеїн-S-кон'югатах ксенобіотиків, які утворюються ензимами печінки. Ці ензими синтезують альдимін. Він зв'язується з піридоксаль 5-фосфатом, а  $\alpha$ -аміногрупа похідного цистеїну, підкислює сусідній протон для  $\beta$ -елімінування тіолмісткого метаболіту та аміноакрилату, останній спонтанно розщеплюється до аміаку і пірувату [20]. Бактерії можуть додатково метаболізувати меркаптани, змінюючи їх фізичні властивості і локалізацію в межах організму. Кишкові бактеріальні C-S  $\beta$ -ліази розщеплюють цистеїн-S-кон'югати поліхлорованих біфенілів для отримання метаболітів тіолів, які далі метилюються і накопичуються в ліпофільних тканинах [21]. Роль C-S ліаз для мікробіоти не зовсім зрозуміла. Ця роль може бути виявленою при вивченні різних піридоксальфосфатних ензимів, які беруть участь у метаболізмі [20], але аміак, що виробляється C-S  $\beta$ -ліазами, може слугувати єдиним джерелом азоту [22].

**Редуктазні ензими.** Бактерії шлунково-кишкового тракту можуть відновлювати широкий спектр функціональних груп, включаючи алкени,  $\alpha$ ,  $\beta$ -ненасичені похідні карбонової кислоти, N-оксид, азо- і сульфоксидні групи. Ензими редуктази використовують різні кофактори, такі як, NADH або NADPH, флавін, Fe-S-кластери, гем, молібденовий кофактор і інші металофактори для перенесення електронів або еквівалентів ( $H^+$ ,  $2e^-$ ) на субстрати [23–25]. Біо-



хімічна та структурна характеристика кишкових бактеріальних редуктаз виявила індивідуальні ензими, у яких зменшена субстратна специфічність, тому вони можуть відновлювати кілька різних функціональних груп (рис. 4).

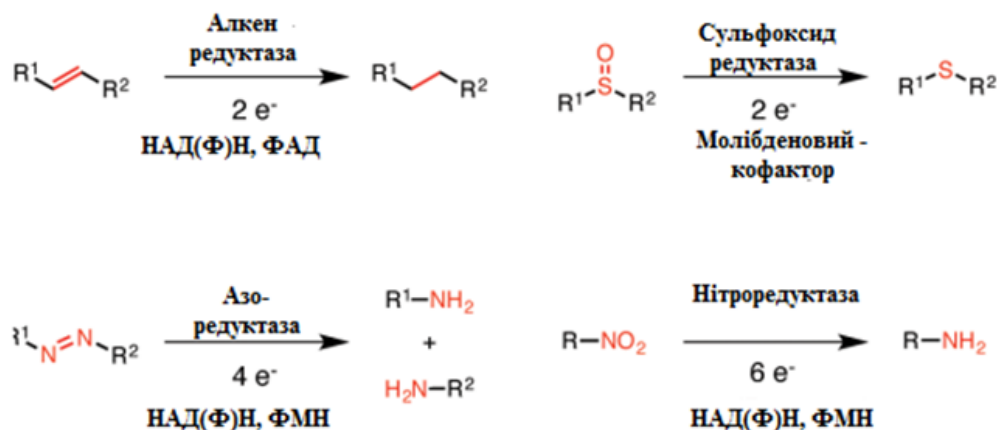


Рис. 4. Редуктази бактерій кишково-шлункового тракту [4]

Fig.4. Bacterial reductases of the gastrointestinal tract [4]

При редукції зазвичай зменшується полярність сполук та інші фізико-хімічні фактори, які можуть впливати на час перебування і активність метаболітів в організмі [26–28]. Перенесення електронів на ксенобіотики може проходити при анаеробному диханні в кишечнику людини.

**Трансферази.** Трансферазні ензими переносять функціональні групи між двома субстратами через реакції нуклеофільного заміщення. Трансферази кишкової мікробіоти передають метильні і ацильні групи. Реакції приєднання вимагають присутності хімічно активованих супутніх структур, таких як ацетил-КоА, АТФ або S-аденозилметіонін [29, 30] (рис.5). По-різному може впливати на біоактивність ксенобіотиків в організмі приєднання і видалення цих функціональних груп. Ацетилювання може служити механізмом детоксикації зменшуючи полярність і полегшуючи екскрецію з мікробних клітин. [31]. Деметилювання ксенобіотиків ензимами людського організму звільняє полярні групи для подальшої кон'югації і виведення з організму [32], але у мікроорганізмів, деметилювання може використовуватися для забезпечення джерелом вуглецю для синтезу клітинної речовини [29].

**Ензими переносники хімічних радикалів.** Ензими, які переносять радикал, генерують високоенергетичні проміжні продукти, що містять неспарені електрони. Такі реакції часто чутливі до кисню і енергетично затратні, але дозволяють бактеріям проводити реакції, які недоступні для інших способів каталізу, включаючи розщеплення і утворення зв'язків (як СС, так і СХ, де Х = N, О або галогеніди) [33]. Величезна кількість ензимів переносять радикали, які використовуються в анаеробному метаболізмі, подібні за хімічним складом. Використовуючи ензимні- або кофакторно-радикальні процеси

ці ензими безпосередньо генерують проміжний радикал на основі субстрату через одноелектронне перенесення або розщеплення гомологічного зв'язку (рис. 6). Цей субстратний радикал перетворюється в радикальний продукт і таким чином завершується каталітичний цикл.

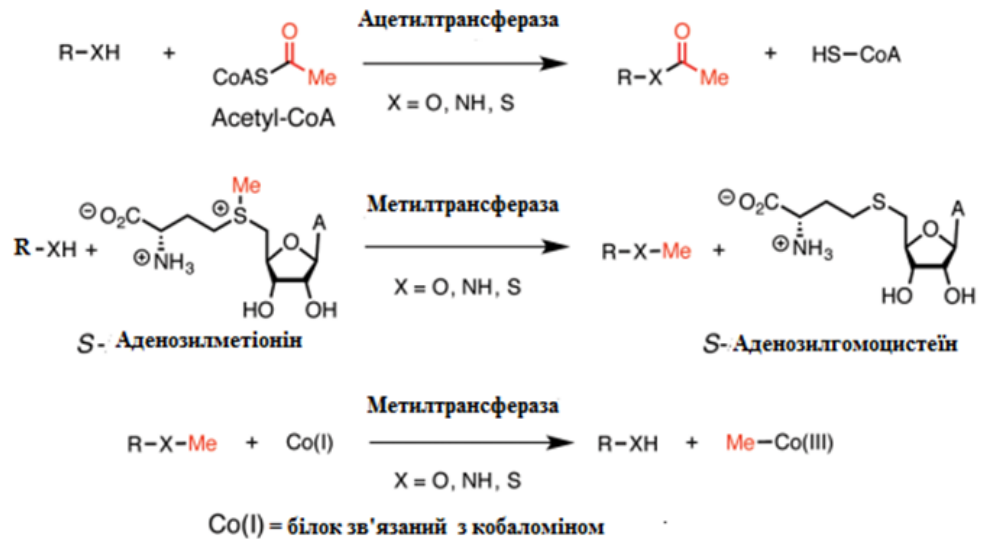


Рис. 5. Трансферази бактерій кишково-шлункового тракту [1]

Fig .5. Bacterial transferases of the gastrointestinal tract [1]

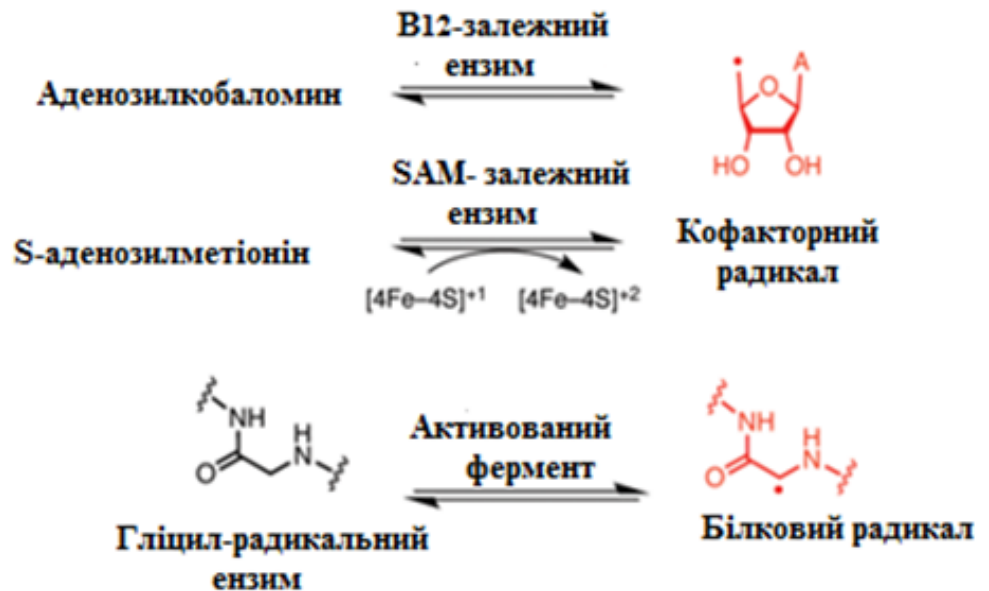


Рис. 6. Радикальні ензими бактерій кишково-шлункового тракту [1]

Fig. 6. Bacterial radical enzymes of the gastrointestinal tract [1]



Ензими кишкових бактерій, які переносять радикали це в основному залежні від S-аденозилметіоніну, від кобаламіну та гліцину. Ці ензими часто опосередковують первинний метаболізм в анаеробних бактеріях і можуть безпосередньо впливати на біодеградацію ксенобіотиків в людському організмі. Реакції, що каталізуються гліцин-радикальними ензимами кишкових бактерій включають утворення триметиламіну (ТМА) з холіну за допомогою ферменту триметиламінази (34) і декарбоксілювання тирозин-похідного метаболіту p-гідроксифенілацетату за допомогою p-гідроксифенілацетат-декарбоксілази (35). В цій останній реакції синтезується p-крезол (36).

### Метаболізм промислових хімічних продуктів кишковою мікробіотою

Бактерії кишечника метаболізують азосполуки за допомогою реакцій відновлення, які є промислово важливими синтетичними продуктами (28). Відновне розщеплення азозв'язків у молекулі призводить до утворення аніліну. Ця реакція може бути виконана за допомогою флавінових або NAD (P) H-залежних ензимів, виявлених у багатьох еукаріот і бактерій [8]. Біологічні наслідки азоредукції змінюються в залежності від субстрату. Хоча бактеріальна трансформація азозмісних барвників призводить до утворення метаболітів, які вважаються нетоксичними [23, 37], у працівників з довгостроковим впливом текстильних барвників підвищена ймовірність розвитку раку сечового міхура (38). Таким чином, токсична дія азосполук може залежати як від індивідуальної будови барвника, так і від наявності специфічних метаболізувальних організмів.

Кишкові бактерії також метаболізують сполуку S-триазин. Меламін – промисловий хімікат, який використовується у виробництві різних пластмас і він є токсичним для людей. Дослідження на мишах показали, що кишкові бактерії дезамінують меламін для отримання аміаку і ціанурової кислоти [39], остання утворює нерозчинний комплекс з меламіном *in vivo*. Цей нерозчинний комплекс викликає токсичні прояви у нирках [40]. Бактерії роду *Klebsiella* беруть участь в утворенні ціанурової кислоти у мишей [39].

### Змінювання токсичності важких металів

Бактерії кишечника не тільки метаболізують органічні сполуки, але і можуть змінювати токсичність важких металів, включаючи бісмут, арсен і ртуть. Ртуть, яка акумулюється в живих організмах, несе загрозу для здоров'я людини, а кишковий бактеріальний метаболізм може впливати на токсичність ртуті і тривалість її знаходження в організмі. Бактерій, які були виділені з фекалій щурів редукують метилртуть до менш токсичної неорганічної ртуті, тим самим полегшують виведення ртуті з організму господаря [41]. Зміни у мікробіоті кишечника у щурів і мишей може призвести до накопичення метилртуті. Вона викликає неврологічні патології [42]. Метилртуть метаболізується шляхом деметилювання. Ензими, які відповідають за метаболізм метилртуті це гомологи ліаз (ртутьредуктази А і В). Вони були виділені та ідентифіковані в ізолятах кишковика людини [43]. Інкубація 16 металів в імітаторі ШКТ суспензіями бактерій *in vitro* показала, що деякі метали зникли, але арсен перетворився у сполуку AsS яка раніше не спостерігалася в біологічних системах [44]. Ці дослідження показали, що є значні прогалини в знаннях про взаємо-



дію кишкової мікробіоти з важкими металами і, як наслідок, про їх токсичну дію.

### Метаболізм кишковою мікробіотою лікарських препаратів

Відомо, що, крім антибіотиків, мікробіота кишечника людини трансформує більш ніж 50 лікарських препаратів, які використовуються при різних хворобах. Крім того, в процесі трансформації у деяких метаболітів з'являються інші фармакологічні властивості [45]. У деяких випадках метаболізм за допомогою кишкової мікробіоти фармацевтичних препаратів викликає різні не сприятливі для організму ефекти: тератогенні [46], токсичні [24,25] і навіть летальні ефекти [47]. Ці дослідження показали складну взаємодію між лікарськими засобами і кишковими бактеріями [48, 49].

Фармацевтичні препарати, які використовуються при захворюваннях шлунково-кишкового тракту, за допомогою бактеріальних ензимів утворюють активні метаболіти. Це може відбуватися або шляхом прямої хімічної модифікації, або опосередковано через взаємодію між мікробіотою кишечника та клітинами людини. За участі ензимів кишкової мікробіоти неактивні попередники препаратів (проліки) перетворюються в фармакологічні активні сполуки. Це протизапальні препарати похідні азосполук, такі як сульфасалазин, який використовують при різних запальних захворюваннях кишечника [27]. Кишкові бактерії редукують сульфасалазин в сульфапіридин і активний протизапальний агент 5-ацетилсаліцилову кислоту, також різні кишкові бактерії можуть додатково метаболізувати 5-ацетилсаліцилову кислоту в N-ацетил-5-ацетилсаліцилову кислоту, метаболіт, який не володіє протизапальною активністю. Крім того, метаболіт N-ацетил-5-ацетилсаліцилової кислоти пригнічує ріст анаеробів, включаючи *Clostridium difficile* [31] і таким чином він може впливати на склад мікробіому кишечника. Інші мікроорганізми кишечника, відповідають за активацію суліндаку, за допомогою відновлення сульфоксиду [50], а також відновлення N-оксиду антидіарейного лікарського засобу лопераміду [28].

Реакція пацієнта на хіміотерапію різко індивідуальна, з погляду ефективності та характеру побічних ефектів, а нові дослідження показують, що відмінності у мікробіоті кишечника можуть сприяти цьому явищу. Спільна інкубація з *E. coli* або *Listeria welshimeri* збільшувала, або зменшувала ефективність половини з 30 протиракових препаратів щодо ліній ракових клітин. Дослідження дії *E. coli* і препаратів (гемцитабін, флударабін і СВ1954) виявили докази прямої хімічної модифікації бактерією [51]. Ці експериментальні дані свідчать про те, що структурна модифікація ліків кишковими або асоційованими з пухлиною бактеріями може сприяти змінам в терапії раку.

Іринотекан являє собою пригнічувач топоізомерази, який використовують для лікування раку. Іринотекан метаболізується за допомогою глюкуроніл-трансферази з утворенням глюкуроніду іринотекану. Цей процес відбувається у печінці. Утворюваний метаболіт є неактивним. Він попадає у кишечник через жовчну екскрецію. Бактеріальні ферменти кишечника  $\beta$ -глюкуронідази гідролізують глюкуронід іринотекану в товстому кишечнику і неактивна сполука стає знов активною [48]. Потім іринотекан потрапляє в кишкові епі-



теліальні клітини та викликає пошкодження клітин кишечника це призводить до важкої діареї. Побічні ефекти обмежують використання цього ефективного лікарського засобу. Таким чином, пригнічення кишкових бактеріальних  $\beta$ -глюкуронідаз є ефективним підходом для запобігання реактивації цього лікарського засобу. Оскільки ці ферменти дуже поширені у кишкових бактеріях і присутні у людей, пригнічувачі мають бути селективними для бактеріальних  $\beta$ -глюкуронідаз і нетоксичні як для клітин людини, так і для інших бактерій кишечника.

Крім модифікації препаратів, які діють локально на шлунково-кишковий тракт, кишковий метаболізм може також впливати на ефективність інших терапевтичних засобів, які використовуються для лікування інших органів людини. Багато прикладів можна знайти серед препаратів для лікування ЦНС. Наприклад, леводопа (L-дофамін) використовується для лікування хвороби Паркінсона, стану, що характеризується смертю дофамінергічних нейронів. L-дофін перетинає гематоенцефалічний бар'єр, де препарат декарбоксілюється ферментами людини для відновлення рівнів дофаміну [52]. Однак обмін речовин в кишечнику людини, а також дія бактеріальних ферментів впливає на концентрацію лікарського засобу, що надходить у мозок. Бактеріальне декарбоксілювання [53] і  $\beta$ -дегідроксилювання перетворюють L-дофамін в м-тирамін, який може бути далі окислений до м-гідроксифенілоцтової кислоти [54]. Поки ще не вивчені кишкові бактерії та ензими, які відповідають за метаболізм L-дофаміну [55].

Екстракти *Digitalis purpurea* (наперстянки) використовуються при серцевій недостатності. [56]. Активним компонентом наперстянки є глікозидний дигоксин, який пригнічує АТФази  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  в міоцитах, викликаючи підвищення концентрації кальцію та посилює м'язове скорочення. Дигоксин має дуже вузьку терапевтичну дію тому потребує ретельного моніторингу, щоб уникнути токсичності. У більш ніж 10% пацієнтів, що приймають дигоксин, виділяють високі рівні метаболіту дигідродигоксину та хімічних структур, які утворюються після відновлення  $\alpha$ ,  $\beta$ -ненасиченого лактону. Спільне застосування дигоксину та антибіотиків зменшувало або скасовувало продукцію дигідродигоксину [57]. З кишечника людини була виділена бактерія *Eubacterium lentum* (перейменована в *Eggerthella lenta*), яка відповідає за метаболізм дигоксину у кишечнику. Хоча роль *E. lenta* у метаболізмі дигоксину оцінювалася десятиліттями, проблеми в культивуванні мікроорганізму і відсутність генетичних інструментів заважало розумінню цього процесу. Для виявлення молекулярних механізмів метаболізму дигоксину було використане секвенування РНК для ідентифікації індукцибельного гену, присутнього тільки в дигоксин-метаболізуювальних штаммах *E. lenta* [26]. В метаболізмі дигоксину бере участь флавінзалежна редуктаза.

Незважаючи на важливе значення кишкової мікробіоти для функціонування організму людини відповідні гени і ферменти, що беруть участь у метаболізмі ксенобіотиків ще мало вивчені. Безсумнівно, необхідно знаходити зв'язки між бактеріальним метаболізмом та ензимами, що каталізують ці процеси та які можливі наслідки цих реакцій для організму людини.



**Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,  
тел.: +380482635761 e-mail: bgalkin@ukr.net

## **БИОТРАНСФОРМАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ МИКРОБИОТОЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА И ЕЁ ПОСЛЕДСТВИЯ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА**

### **Реферат**

*В обзоре проанализированы литературные данные о биотрансформации ксенобитиков микробиотой желудочно-кишечного тракта человека. Приведены основные ферменты, участвующие в биотрансформации. Показана роль биотрансформации ферментов микробиоты в активации и ингибировании лекарственных средств, детоксикации и интоксикации чужеродных соединений и тяжелых металлов.*

*Ключевые слова: кишечная микробиота, биотрансформация ксенобитиков, энзимы, красители, тяжёлые металлы, лекарственные препараты*

**B.N. Galkin, T.O. Filipova**

Odessa I.I. Mechnikov National University,  
st. Dvoryanskaya, 2, Odessa, 65082, Ukraine

## **BIOTRANSFORMATION OF THE XENOBIOTICS BY MICROBIOTA OF THE GASTROINTESTINAL TRACT AND ITS CONSEQUENCES FOR HUMANS**

### **Summary**

*The review analyzes the literature data on the biotransformation of xenobiotics by the microbiota of the human gastrointestinal tract. The main enzymes involved in biotransformation are presented. The role of biotransformation of microbiota enzymes in the activation and inhibition of drugs, detoxification and intoxication of foreign compounds and heavy metals is shown.*

*Key words: intestinal microbiota, biotransformation xenobiotics, enzymes, dyes, heavy metals, drugs*

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Koppel N., Rekdal V-M., Balskus E.P. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota // *Science*. – 2017. – V. 356(6344). – P. 1–11.
2. Sender R., Fuchs S., Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body // *PLOS Biology*. – 2016. – V. 14(8). – e1002533.
3. Aron-Wisnewsky J., Doré J., Clement K. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2012. – V. 9. – No.10. – P. 590–598.
4. Eckburg P. B. Diversity of the human intestinal microbial flora // *Science*. – 2005. – V.308(572). – P. 1635–1638.





5. Wang, B. Hu, L., Siahaan, T. Drug Delivery: Principles and Applications. Wiley: 2016. – 757p.
6. Sousa T., Paterson R., Moore V. et al. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs // *Int. J. Pharmac.* – 2008. – V. 363. – №1–2. – P. 1–25.
7. Галкін Б. М., Іваниця В. О., Філіпова Т.О. Механізми біодеградації ксенобіотиків. – Одеса : ОНУ імені І. І. Мечникова, 2017. – 148 с.
8. Linhardt R. J., Galliher P. M., Cooney C. L. Polysaccharide lyases // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1987. – V. 12 (2). – P. 135–176.
9. Ryan A., Kaplan E., Nebel J.-C. et al. Identification of NAD(P)H quinone oxidoreductase activity in azoreductases from *P. aeruginosa*: Azoreductases and NAD(P)H quinone oxidoreductases belong to the same FMN-dependent superfamily of enzymes // *PLoS.* – 2014. – V. 9(6). – e98551.
10. Martínez-del Campo A., Bodea S., Hamer H. A. et al. Characterization and detection of a widely distributed gene cluster that predicts anaerobic choline utilization by human gut bacteria // *mBio.* – 2015. – V. 6 (2). – e00042.
11. Kaoutari A. E., Armougom F., Gordon J. I. et al. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. – V. 11 (7). – P. 497–504.
12. Levin B. J., Huang Y. Y., Peck S. C. et al. A prominent glyceryl radical enzyme in human gut microbiomes metabolizes trans-4-hydroxy-L-proline // *Science.* – 2017. – V. 355(6325). – eaai8386.
13. Jancova P., Anzenbacher P., Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* – 2019. – V.154(1). – P. 103–116.
14. Wang J., Yadav V., Smart A. L. et al. Stability of peptide drugs in the colon // *Eur. J. Pharmac. Sci.* – 2015. – V. 78(1). – P. 31–36.
15. Tozaki H., Emi Y., Horisaka E., Fujita T. et al. Degradation of insulin and calcitonin and their protection by various protease inhibitors in rat caecal contents: Implications in peptide delivery to the colon // *J. Pharmacy Pharm.* – 1997. – V. 49(2). – P. 164–168.
16. Wallace B. D., Roberts A. B., Pollet R. M. et al. Structure and inhibition of microbiome  $\beta$ -glucuronidases essential to the alleviation of cancer drug toxicity // *Chem. Biol.* – 2015. – V. 22(9). – P. 1238–1249.
17. Ulmer J. E., Vilén E. M., Namburi R. B. et al. Characterization of glycosaminoglycan (GAG) sulfatases from the human gut symbiont bacteroides the taioaomicron reveals the first GAG-specific bacterial endosulfatase // *J. Biol. Chem.* – 2014. – V. 289(35). – P. 24289–24303.
18. Lukatela G., Krauss N., Theis K., et al. Crystal structure of human arylsulfatase A: The aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis // *Biochem.* – 1998. – V. 37(11). – P. 3654–3664.
19. Donohoe D. R., Garge N., Zhang X. et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon // *Cell Metab.* – 2011. – 13(5). – P. 517–526.
20. Cooper A. J. L., Krasnikov B. F., Niatsetskaya Z. V. et al. Cysteine S-conju-



- gate  $\beta$ -lyases: important roles in the metabolism of naturally occurring sulfur and selenium-containing compounds, xenobiotics and anticancer agents // *Amino Acids*. – 2010. – V. 4. – No.1. – P. 7–27.
21. Claus S. P., Guillou H., Ellero-Simatos S. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? // *Npj Biofilms and Microbiomes*. – 2016. – V. 2,(1). – P.1–11.
  22. Rossol I., Pühler A. The *Corynebacterium glutamicum* *aecD* gene encodes a C-S lyase with alpha, beta-elimination activity that degrades aminoethylcysteine // *J. Bacteriol.* – 1992. – V. 174. – № 9. – P. 2968–2977.
  23. Rafii F., Hall J. D., Cerniglia C. E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract // *Food Chem. Toxicol.* – 1997. – V. 35(9). – P. 897–901.
  24. Lee S. C., Renwick A. G. Sulphoxide reduction by rat intestinal flora and by *Escherichia coli* in vitro // *Biochem. Pharm.* – 1995. – V. 49. – №11. – P. 1567–1576.
  25. Laue H., Friedrich M., Ruff J., Cook A. M. Dissimilatory sulfite reductase (Desulfoviridin) of the taurine-degrading, non-sulfate-reducing bacterium *Bilophila wadsworthia* RZATAU contains a fused DsrB-DsrD subunit // *J. Bacteriol.* – 2001. – V.183. – № 5. – P. 1727–1733.
  26. Haiser H. J., Gootenberg D. B., Chatman K. et al. Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta* // *Science*. – 2013. – V. 341(6143). – P. 295–298.
  27. Peppercorn M. A., Goldman P. The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine // *J. Pharm. Exp. Therap.* – 1972. – V.181(3). – P. 555–562.
  28. Lavrijsen K., van Dyck D., van Houdt J. et al. Reduction of the prodrug loperamide oxide to its active drug loperamide in the gut of rats, dogs, and humans // *Drug Metab. Dispos.* – 1995. – V. 23(3). – P. 354–362.
  29. Kumano T., Fujiki E., Hashimoto Y., Kobayashi M. Discovery of a sesamin-metabolizing microorganism and a new enzyme // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2016. – V. 113(32). – P. 9087–9092.
  30. Ticak T., Kountz D. J., Girosky K. E. et al. A nonpyrrolysine member of the widely distributed trimethylamine methyltransferase family is a glycine betaine methyltransferase // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2014. – V. 111(43). – P. E4668–E4676.
  31. Delomenie C., Fouix S., Longuemaux S. et al. Identification and functional characterization of arylamine N-Acetyltransferases in eubacteria: Evidence for highly selective acetylation of 5-aminosalicylic acid // *J. Bacteriol.* – 2001. – V. 183. – No.11. – P. 3417–3427.
  32. Sutton D., Butler A. M., Nadin L., Murray M. Role of CYP3A4 in Human Hepatic Diltiazem N-Demethylation: Inhibition of CYP3A4 Activity by Oxidized Diltiazem Metabolites // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1997. – V.282(1). – P.294–300.
  33. Buckel W., Golding B. T. Radical enzymes in anaerobes // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2006. – V.60(1). – P. 27–49.



34. Bodea S., Funk M. A., Balskus E. P., Drennan C. L. Molecular basis of C–N bond cleavage by the glycy radical enzyme choline trimethylamine-lyase // *Cell Chem. Biol.* – 2016. – V. 23(10). – P. 1206–1216.
35. Selmer T., Andrei P. I. p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile* // *Euro. J. Biochem.* – 2001. – V. 268(5). – P. 1363–1372.
36. Clayton T. A., Baker D., Lindon J. C. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2009. – V.106. – No.34. – P. 14728–14733.
37. Borzelleca J. F., Depukat K., Hallagan J. B. Lifetime toxicity/carcinogenicity studies of FD & C blue No. 1 (Brilliant blue FCF) in rats and mice // *Food Chem. Toxicol.* – 1990. – V.28. – No.4.- P. 221–234.
38. Singh Z., Chadha P. Textile industry and occupational cancer// *J. Occup. Med. Toxicol.* – 2016. – V. 11(1). – P.1-6.
39. Ingelfinger J. R. Melamine and the global implications of food contamination // *New Eng. J. Med.* – 2008. – V. 359(26). – P. 2745–2748.
40. Zheng X., Zhao A., Xie G. Melamine-induced renal toxicity is mediated by the gut microbiota // *Sci. Trans. Med.* – 2013. – V.5 (172). – P. 172ra22 (1–10).
41. Rowland I. R., Davies M. J. Grasso P. Metabolism of methylmercuric chloride by the gastro-intestinal flora of the rat// *Xenobiotica.* –1978. – V. 8. – №1. – P. 37–43.
42. Rowland I. R., Davies M. J., Evans J. G. The effect of the gastrointestinal flora on tissue content of mercury and organomercurial neurotoxicity in rats given methylmercuric chloride // *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* – 1980. – V. 8(1). – P. 79–82.
43. Liebert C. A., Wireman J., Smith T., Summers A. O. Phylogeny of mercury resistance (mer) operons of gramnegative bacteria isolated from the fecal flora of primates // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63(3). –P.1066–1076.
44. Diaz-Bone R. A., van de Wiele T. R. Biovolatilization of metal(loid)s by intestinal microorganisms in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem // *Environ. Sci. Tech.* – 2009. – V.43. –No.14. – P. 5249–5256.
45. Spanogiannopoulos P., Bess E. N., Carmody R. N., Turnbaugh P. J. The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2016. – V.14 (5). – P. 273–287.
46. Takeno S. Comparative developmental toxicity and metabolism of nitrazepam in rats and mice // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1993. – V.121. No.2. – P. 233–238.
47. Okuda H., Nishiyama A., Ogura K. et al. Lethal drug interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs // *Drug Metab. Dispos.* – 1997. – V. 25(2). – P. 270–273.
48. Vetizou M., Pitt J. M., Daillere R. et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota // *Science.* – 2015. – V. 350 (6264). – P. 1079–1084.
49. Shin N.-R., Lee J.-C., Lee H.-Y. et al. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in



- diet-induced obese mice // *Gut*. – 2013. – V. 63(5). – P.727–735.
50. Strong H. A., Renwick A. G., George C. F. et al. The reduction of sulphinpyrazone and sulindac by intestinal bacteria // *Xenobiotica*. –1987. –V. 17. – No. 6. – P. 685–696.
  51. Lehouritis P., Cummins J., Stanton M., et al. Local bacteria affect the efficacy of chemotherapeutic drugs // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5(1) – P. 1–12.
  52. Calne D. B., Reid J. L., Vakil S. D. et al. Idiopathic parkinsonism treated with an extracerebral decarboxylase inhibitor in combination with levodopa // *BMJ*. –1971. – V. 3 (5777). – P. 729–732.
  53. Bergmark J., Carlsson A., Granerus A.-K. et al. Decarboxylation of orally administered l-dopa in the human digestive tract// *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.* – 1972. – V.272 . –No. 4. – P. 437–440.
  54. Goldin B. R., Peppercorn M. A., Goldman P. Contributions of host and intestinal microflora in the metabolism of L-dopa by the rat. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1973. – V. 186. – No. 1. – P. 160–166.
  55. Sharon G., Sampson T. R., Geschwind D. H., Mazmanian S. K. The central nervous system and the gut microbiome // *Cell*. – 2016. – V. 167 (4). – P. 915–932.
  56. Lindenbaum. J., Rund D. G., Butler V. P. Inactivation of digoxin by the gut flora: Reversal by antibiotic therapy // *New Eng. J. Med.* – 1981. – V. 305 . – No.14. – P. 789–794.
  57. Saha R. I., Butler V., Neu H., Lindenbaum J. Digoxin-inactivating bacteria: identification in human gut flora // *Science*. –1983. –V. 220 (4594). – P. 325–327.

### References

1. Koppel N, Rekdal V-M, Balskus EP Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota // *Science*. 2017; 356(6344): 1–11.
2. Sender R, Fuchs S, Milo R Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body // *PLOS Biology*. 2016; 14(8): e1002533.
3. Aron-Wisnewsky J, Doré J, Clement . The importance of the gut microbiota after bariatric surgery // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2012; 9(10): 590–598.
4. Eckburg PB Diversity of the human intestinal microbial flora // *Science*. 2005; 308(572):1635–1638.
5. Wang B, Hu L, Siahaan T Drug Delivery: Principles and Applications, Wiley, 2016:757p.
6. Sousa T, Paterson R, Moore V et al. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs // *Int. J. Pharmac.* 2008; 363(1–2): P. 1–25.
7. Galkin BM, Ivanytia VO, Filipova TO Mechanisms of biodegradation of xenobiotics, Odessa, II Mechnikov ONU, 2017: 148 p (in Ukraine).
8. Linhardt RJ, Galliher PM, Cooney CL Polysaccharide lyases // *Appl. Biochem. Biotechnol*. 1987; 12 (2): 135–176.
9. Ryan A, Kaplan E, Nebel J-C et al. Identification of NAD(P)H quinone oxidoreductase activity in azoreductases from *P. aeruginosa*: Azoreductases



- and NAD(P)H quinone oxidoreductases belong to the same FMN-dependent superfamily of enzymes // PLoS. 2014; 9(6): e98551.
10. *Martínez-del Campo A, Bodea S, Hamer H A et al* Characterization and detection of a widely distributed gene cluster that predicts anaerobic choline utilization by human gut bacteria // *mBio*. 2015; 6 (2): e00042.
  11. *Kaoutari AE, Armougom F, Gordon J I et al* The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota // *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11 (7):497–504.
  12. *Levin BJ, Huang YY, Peck SC et al* A prominent glyceryl radical enzyme in human gut microbiomes metabolizes trans-4-hydroxy-L-proline // *Science*. 2017 ; 355(6325): eaai8386.
  13. *Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E* Phase II drug metabolizing enzymes // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2019; 154(1): 103–116.
  14. *Wang J, Yadav V, Smart A L et al* Stability of peptide drugs in the colon // *Eur. J. Pharmac. Sci.* 2015; 78(1): 31–36.
  15. *Tozaki H, Emi Y, Horisaka E, Fujita T et al* Degradation of insulin and calcitonin and their protection by various protease inhibitors in rat caecal contents: Implications in peptide delivery to the colon // *J. Pharmacy Pharm.* 1997; 49(2): 164–168.
  16. *Wallace BD, Roberts AB, Pollet RM et al* Structure and inhibition of microbiome  $\beta$ -glucuronidases essential to the alleviation of cancer drug toxicity // *Chem. Biol.* 2015; 22(9): 1238–1249.
  17. *Ulmer JE, Vilén EM, Namburi RB et al.* Characterization of glycosaminoglycan (GAG) sulfatases from the human gut symbiont bacteroides the taiotaomicron reveals the first GAG-specific bacterial endosulfatase // *J. Biol. Chem.* 2014; 289(35): 24289–24303.
  18. *Lukatela G, Krauss N, Theis K, et al.* Crystal structure of human arylsulfatase A: The aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis // *Biochem.* 1998; 37(11):3654–3664.
  19. *Donohoe DR, Garge N, Zhang X et al.* The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon // *Cell Metab.* 2011; 13(5): P. 517–526.
  20. *Cooper AJL, Krasnikov BF, Niatsetskaya ZV et al.* Cysteine S-conjugate  $\beta$ -lyases: important roles in the metabolism of naturally occurring sulfur and selenium-containing compounds, xenobiotics and anticancer agents // *Amino Acids.* 2010; 4(1): P. 7–27.
  21. *Claus SP, Guillou H, Ellero-Simatos S* The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? // *Npj Biofilms and Microbiomes.* 2016; 2(1):1-11.
  22. *Rossol I, Pühler A* The *Corynebacterium glutamicum* aecD gene encodes a C-S lyase with alpha, beta-elimination activity that degrades aminoethylcysteine // *J. Bacteriol.* 1992; 174(9): 2968–2977.
  23. *Rafii F, Hall JD, Cerniglia CE* Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium species* from the human intestinal tract // *Food Chem. Toxicol.* 1997; 35(9): 897–901.



24. Lee SC, Renwick AG Sulphoxide reduction by rat intestinal flora and by *Escherichia coli* in vitro // Biochem. Pharm. 1995; 49(11): 1567–1576.
25. Laue H, Friedrich M, Ruff J, Cook AM Dissimilatory sulfite reductase (Desulfoviridin) of the taurine-degrading, non-sulfate-reducing bacterium *Bilophila wadsworthia* RZATAU contains a fused DsrB-DsrD subunit // J. Bacteriol. 2001;183(5):1727–1733.
26. Haiser HJ, Gootenberg DB, Chatman K et al Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta* // Science. 2013; 341(6143): 295–298.
27. Peppercorn MA, Goldman P The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine // J. Pharm. Exp. Therap. 1972; 181 (3): 555-562.
28. Lavrijsen K, van Dyck D, van Houdt J et al. Reduction of the prodrug loperamide oxide to its active drug loperamide in the gut of rats, dogs, and humans // Drug Metab. Dispos. 1995; 23(3): 354–362.
29. Kumano T, Fujiki E, Hashimoto Y, Kobayashi M Discovery of a sesamin-metabolizing microorganism and a new enzyme // Proc. Nat. Acad. Sci. 2016; 113(32): 9087–9092.
30. Ticak T, Kountz DJ, Girosky KE et al. A nonpyrrollysine member of the widely distributed trimethylamine methyltransferase family is a glycine betaine methyltransferase // Proc. Nat. Acad. Sci. 2014;111 (43): E4668–E4676.
31. Delomenie C, Fouix S, Longuemaux S et al. Identification and functional characterization of arylamine N-Acetyltransferases in eubacteria: Evidence for highly selective acetylation of 5-aminosalicylic acid // J. Bacteriol. 2001;183.(11): 3417–3427.
32. Sutton D, Butler AM, Nadin L, Murray M Role of CYP3A4 in Human Hepatic Diltiazem N-Demethylation: Inhibition of CYP3A4 Activity by Oxidized Diltiazem Metabolites // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997; 282 (1): 294-300.
33. Buckel W, Golding BT Radical enzymes in anaerobes // Ann. Rev. Microbiol. 2006; 60 (1): 27–49.
34. Bodea S, Funk MA, Balskus EP, Drennan CL Molecular basis of C–N bond cleavage by the glycy radical enzyme choline trimethylamine-lyase // Cell Chem. Biol. 2016; 23(10): 1206–1216.
35. Selmer T, Andrei PI p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile* // Euro. J. Biochem 2001; 268(5):1363–1372.
36. Clayton TA, Baker D, Lindon JC Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism // Proc. Nat. Acad. Sci. 2009; 106(34): 14728–14733.
37. Borzelleca JF, Depukat K, Hallagan JB Lifetime toxicity/carcinogenicity studies of FD & C blue No. 1 (Brilliant blue FCF) in rats and mice // Food Chem. Toxicol. 1990; 28(4): 221–234.
38. Singh Z, Chadha P Textile industry and occupational cancer // J. Occup. Med. Toxicol. 2016; 11(1): 1-6.
39. Ingelfinger JR Melamine and the global implications of food contamination // New Eng. J. Med. 2008; 359(26): 2745–2748.
40. Zheng X, Zhao A, Xie G Melamine-induced renal toxicity is mediated by the gut microbiota // Sci. Trans. Med. 2013; 5 (172): 172ra22 (1-10).



41. Rowland IR, Davies MJ, Grasso P Metabolism of methylmercuric chloride by the gastro-intestinal flora of the rat // *Xenobiotica* 1978;8(1): 37–43.
42. Rowland IR, Davies MJ, Evans JG The effect of the gastrointestinal flora on tissue content of mercury and organomercurial neurotoxicity in rats given methylmercuric chloride // *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* 1980; 8(1): 79–82.
43. Liebert CA, Wireman J, Smith T, Summers AO Phylogeny of mercury resistance (mer) operons of gramnegative bacteria isolated from the fecal flora of primates // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63(3): 1066–1076.
44. Diaz-Bone RA, van de Wiele TR Biovolatilization of metal(loid)s by intestinal microorganisms in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem // *Environ. Sci. Tech.* 2009;43 (14): 5249–5256.
45. Spanogiannopoulos P, Bess EN, Carmody RN, Turnbaugh PJ The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016; 14(5): 273–287.
46. Takeno S Comparative developmental toxicity and metabolism of nitrazepam in rats and mice // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1993; 121(2): 233–238.
47. Okuda H, Nishiyama A, Ogura K et al. Lethal drug interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs // *Drug Metab. Dispos.* 1997; 25(2): 270–273.
48. Vetizou M, Pitt J-M, Daillere R et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota // *Science.* 2015; 350 (6264): 1079–1084.
49. Shin N-R, Lee J-C, Lee H-Y et al. An increase in the *Akkermansia spp.* population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice // *Gut.* 2013; 63(5):727–735.
50. Strong HA, Renwick AG, George CF et al. The reduction of sulphinpyrazone and sulindac by intestinal bacteria // *Xenobiotica.* 1987; 17(6): 685–696.
51. Lehouritis P, Cummins J, Stanton M, et al. Local bacteria affect the efficacy of chemotherapeutic drugs // *Sci. Rep.* 2015; 5(1):1-12.
52. Calne DB, Reid JL, Vakil SD et al. Idiopathic parkinsonism treated with an extracerebral decarboxylase inhibitor in combination with levodopa // *BMJ.* 1971; 3 (5777): 729–732.
53. Bergmark J, Carlsson A, Granerus A-K et al. Decarboxylation of orally administered l-dopa in the human digestive tract // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.* 1972; 272(4):437–440.
54. Goldin BR, Peppercorn MA, Goldman P Contributions of host and intestinal microflora in the metabolism of L-dopa by the rat // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1973; 186(1):160–166.
55. Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK The central nervous system and the gut microbiome // *Cell.* 2016; 167 (4): 915–932.
56. Lindenbaum J, Rund DG, Butler VP Inactivation of digoxin by the gut flora: Reversal by antibiotic therapy // *New Eng. J. Med.* 1981;305(14):789–794.
57. Saha RI, Butler V, Neu H, Lindenbaum J Digoxin-inactivating bacteria: identification in human gut flora // *Science* 1983; 220 (4594): 325–327.

Стаття надійшла до редакції 05.09.2020 р.



N.A. Yamborko<sup>1</sup>, G.O. Iutynska<sup>1</sup>, A.M. Dugan<sup>2</sup>,  
D.O. Farfolameieva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine,  
Acad. Zabolotny Str., 154 Kyiv, 03143, Ukraine.  
e-mail: yamborkon@gmail.com

<sup>2</sup>National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic  
Institute", Peremogi Av., 37, Kyiv, 03056, Ukraine

### STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA IMV B-7288 AS THE PROMISING DESTRUCTOR OF HEXACHLOROCYCLOHEXANE ISOMERS COMPLEX AT AEROBIC CONDITIONS

***Aim** of the research was identification the "one promising" microorganism-destroyer of organochlorine hexachlorocyclohexane isolated among microorganisms from places with total pesticide contamination, after studying its resistance and destruction. **Methods.** Laboratory selection of microorganisms was carried out by microbiological methods on agar plate. Identification of the isolates was realized over polyphase approach by API test method and sequence of the 16S rRNA gene fragment, followed by comparison of the results with the GenBank database using the BLASTN program. Research the ability to decompose the HCH-isomers complex ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ ) were studied in liquid media by gas chromatography. **Results.** On the basis of resistance to the insecticide hexachlorocyclohexane microbial isolate №6 was selected as the most promising strain and identified as *Stenotrophomonas maltophilia* IMV B-7288. The strain was tolerant to high (1000 mg/L) concentrations of insecticide growing on agar plate. In a liquid medium for 7 days of cultivation under aerobic conditions, the strain decomposed hexachlorocyclohexane isomers ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ ) by 61.6–82.1% of its initial content (20 mg/L). **Conclusions.** The selected strain of *Stenotrophomonas maltophilia* IMV B-7288 is an effective destructor of hexachlorocyclohexane isomers and its derivatives and can be promising for using in environmental friendly technologies.*

*Key words:* *Stenotrophomonas maltophilia, hexachlorocyclohexane, lindane, biodegradation, sequence of 16S rRNA.*

Halogenated compounds are often considered to be relatively recalcitrant in many surface environments, such as soils, sediments, and groundwaters, due in part to their chemical stability and in other part to the lack of appropriate microbial activity for their degradation [14]. Moreover, insecticide gamma-hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ -HCH or Lindane) can negatively influences the activities of microbial communities in impacted habitats [1].





Therefore, the necessity exists of finding indigenous soil microorganisms resistant/ decomposing of chlorinated pesticides at different concentrations: low in agricultural applications, medium and high at wood treatment or spill sites. There are a sufficient number of reports about the destruction of a chlorinated cycloaliphatic compound ( $\gamma$ -HCH) under anaerobic conditions [8, 10]. But there are in Ukraine many areas with varying levels of pollution where it is not possible to create anaerobic conditions for microbial destruction of HCH-isomers [13]. In consequence of above it is necessary to research the autochthon (indigenous) aerobic soil microorganisms having natural resistance to HCH in heavily polluted areas, in order to obtain highly efficient destructors capable to decompose HCH-isomers and simultaneously to synthesize plant grows regulators for remediation/phytoremediation of polluted soil.

### Materials and Methods

In our previous study we have isolated the natural steady to chloroorganic contaminations microbial association named Micros [15]. Micros association was selected from soil area with high organochlorines pollution level where lindane ( $\gamma$ -HCH) has been applied and stored over 40 years for agricultural and industrial purposes. The strain №6 resistant to the HCH-isomers ( $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH (lindane),  $\delta$ -HCH) was isolated from this association and cultivated on liquid Menkina's mineral nutrition (MMN) medium (pH 7.2) (containing per liter: 4.0 g of glucose, 2.0 g of  $\text{NaNO}_3$ , 0.5 g of KCl, 200 mg of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 100 mg of  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) [11]. Also nutrition medium contained chloroorganic technical waste with total HCH- concentration 20 mg/L as supporting selective factor. For microbial isolate cultivation at high concentration of HCH-isomers we also used peptone containing M17 medium (Oxoid, Hampshire, England) and pure analytical hexane solution of HCH-isomers (Alsi Ltd.) in concentration range from 100 to 1000 mg/L. The cultivation was performed at rotating conditions with 240 rpm/minute and  $28 \pm 0.1^\circ\text{C}$  for 7 days. As a control has been used sterile nutrition medium with toxicant without microorganisms.

To identify the isolate №6, classical methods were used to study their physiological and biochemical characteristics. Cell morphology studies were carried out by microscopic examination of smears of daily cultures, stained according to Gram's method. To determine the mobility of the researched microbial cells we studied the preparations of daily living cultures, which were cultivated on the nutrient medium M17. The oxidase and catalase activity of the strains was determined according to Kovacs [11].

The microbial isolate was identify using the API 20 NE system (BioMerieux, France), for non-fermenting Gram-negative rods. After 4 days of cultivation in the stationary phase of growth on MMN medium [11], colonies were recovered from the Petri plates suspended with a sufficient quantity of 0.85% (wt/vol) NaCl buffer to reach  $10^9$  bacteria cells per ml. This suspension was used to inoculate the API 20 NE strip (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) bacterial identification systems according to the manufacturer's recommendations.

The method of partial sequencing of the 16SrRNA gene were used. The isolation and purification of bacterial DNA was performed in the exponential



growth phase from 2–3 daily culture using the “Sorb-B DNA” kit according to the manufacturer’s recommendations.

The amplification of 16S-rRNA gene fragments was performed using two universal primers: forward RNNF1 5' -CGG-CCC-AGA-CTC-CTA-CGG-GAG-GCA-GCA-3' and reverse RNNR2 5' -GCG-TGG-ACT- ACC-AGG-GTA-TCT-AAT-CC – 3' by PCR reaction on the “2720 Thermal Cycler” amplifier.

PCR amplification was performed in a total volume of 50  $\mu$ l, each reaction mixture containing: H<sub>2</sub>O – 17  $\mu$ l, mixture of dNTP – 5  $\mu$ l/l, 1,0m Meach primer, 5  $\mu$ l of TaqDNA polymerase (10 U/ $\mu$ l) (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France) in a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 125 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ l and 7.5  $\mu$ l bacterial DNA samples. The amplification temperature conditions were as follows: initial denaturation – 5 min at 94 °C, the next 35 cycles – denaturation 30 sec at 94 °C, hybridization of primers 30 sec at 55 °C, polymerization 30 sec at 72 °C, final cooling to 4 °C. Analysis of PCR products was performed by electrophoresis for a period of 20 min on a 1% (wt/vol) agarose gel with ethidium bromide (1 $\mu$ l/ml), at a voltage of 10 V/cm. To determine the molecular mass (weight) and amount of DNA marker SM0403 (Fermentas Ltd.) was used.

The sequence was implemented according to the standard protocol using genetic analyzer “3130 Genetic Analyzer” with a set of sequence reagents “BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit”.

The analysis of obtained nucleotide sequence 476 n.p was performed using the BLASTN program, comparing them with the homologous nucleotide sequences of the 16S-rRNA gene detected in GenBank.

To study the ability to decompose the HCH, the isolated strain №6 have been cultivated on a MMN medium containing 20 mg/L (pure analytical substances) HCH isomer complex. Microorganisms have been cultivated in Erlenmeyer’s flasks with rotating 240 rpm/h at 28 °C for 7 days. Microbial biomass was separated by centrifugation at 12000. The determination of HCH-isomers amounts was carried out in the microbial supernatants by gas chromatography according to the recommendations of the Environmental protection association (EPA) [12].

The analysis of HCH-isomers was performed applying an HP-5 column (length 30 m, internal diameter 0.32 mm, phase thickness 0.25  $\mu$ m (HP cat. No. 19091J-413).

Destruction activity have been calculating in % for every HCH-isomer, according to initial content at nutrition medium.

Statistical analyses. The study was conducted in triplicates. Statistical analysis of the results were performed using MS Excel 2013. The percentage were calculated using data n=3 [3, 9].

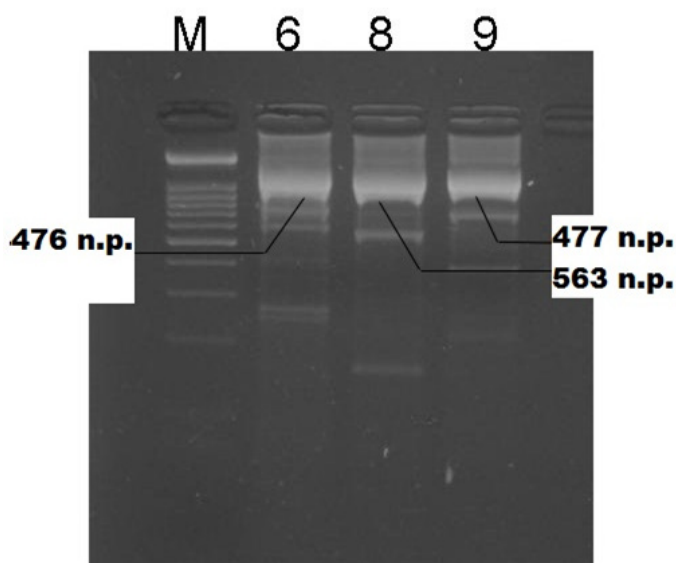
### Results and discussion

The HCH-resistant bacterium isolate №6 was found to form beige opaque flat colonies with clean edges on M17 medium agar Petri plates. It was gram-negative aerobic, non-fermentative bacterium; motile due to polar flagella, catalase-positive, oxidase-negative non-spore-forming rods, slightly smaller 0.5 $\times$ 2.0 and 0.4–0.6  $\mu$ m in size with rounded ends.



According to the data used a special software and according to the API identification system (with ID 99.9%) the isolate №6 belongs to the species *Stenotrophomonas maltophilia*.

Since the polyphase method is used to determine the taxonomic position of microorganisms, based on the study of both physiological, biochemical and molecular genetic characteristics of investigated microorganism [6], we used molecular biological method for studying isolate №6. The nucleotide sequence of 16S rRNA gene fragment (476 bp) was determined. The results of the amplification with universal primers RNNF1 (direct) RNNR2 (reverse) are presented by electrophoresis data in 1.5% agarose gel of the obtained PCR products (Fig. 1).



**Fig. 1. PCR products 16S rRNA: M – marker SM0403; 6 – *S. maltophilia* 6; 8 – *S. maltophilia* 8 (the one experimental strain); 9 – *P. putida* 9**

The amplifiers of the 16S rRNA gene were sequenced and their nucleotide sequences were obtained. Using the BLASTN program, in the GenBank database, homologous nucleotide sequences were compared.

The strain №6 have 99% homology of the nucleotide sequence with a fragment of the 16S rRNA gene *S. maltophilia* 0450 (EU604758.1) and *S. maltophilia* LQB22 (GQ861457.1), which confirms belonging of isolate №6 to species *S. maltophilia*.

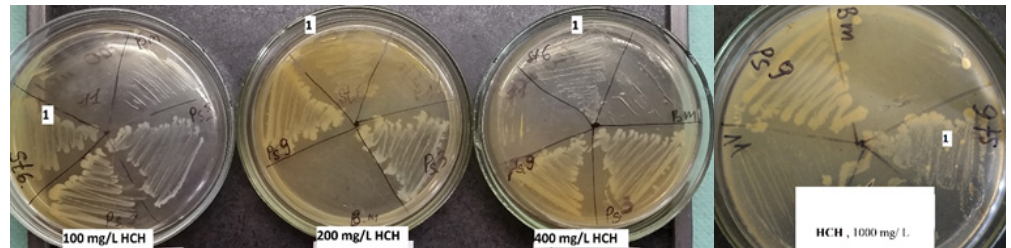
This microbial strain was included into Ukrainian collection of microorganisms and in depository as *Stenotrophomonas maltophilia* IMV B-7288.

The ability to destroy chloroorganic pollutions by fluorescent Pseudomonads was previously described [4], but there are a little data about similar properties of the *Stenotrophomonas* strains. It is known that *S. maltophilia* KB2 was used to metabolize broad range of aromatic compounds including phenol, some chloro- and methylphenols, benzoicacids, catechols, and others [5]. It is known that representa-

tives of *S. maltophilia* are found ubiquitously distributed in soil and often associated with roots of many plant species.

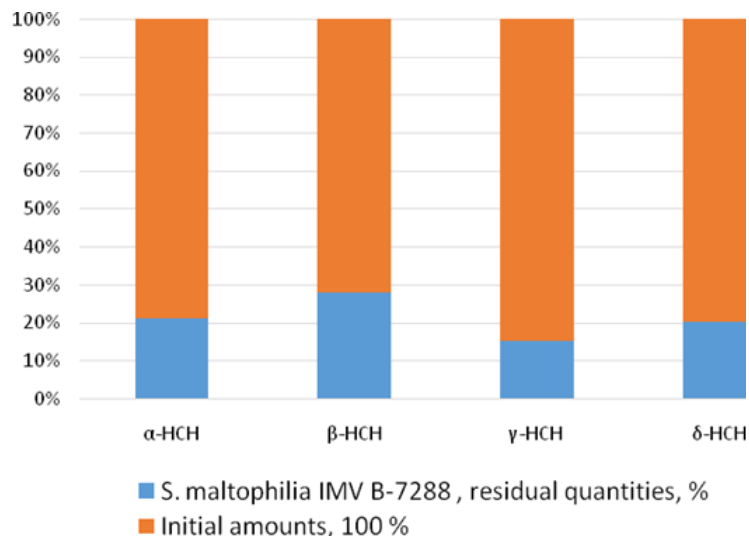
The result is very interesting for natural selected strain isolated from polluted area without any genomic manipulations. This was to be expected, because such a huge potential for biodegradation is consistent with the well-known literature on the high functional flexibility and ubiquity of *Stenotrophomonas*.

*S. maltophilia* IMV B-7288 demonstrates the strong ability to grow at presence high-concentration of four HCH-isomers (hexachlorocyclohexane) (Fig. 2).



**Fig. 2. The microbial growth on Petri plates (M17 nutrition medium) with concentration 100, 200, 400 and 1000 mg/L of HCH-isomers complex: 1- *S. maltophilia* IMV B-7288**

The HCH-isomers degradation activity of *S. maltophilia* IMV B-7288 have been revealed under laboratory conditions (Fig. 3). We can see that *S. maltophilia* IMV B-7288 demonstrates the strong ability to decompose HCH-isomers complex. During 7 days the decomposition level of  $\alpha$ -isomer of HCH was 73.4%,  $\beta$ -HCH - 61.6%,  $\gamma$ -HCH - 82.1%,  $\delta$ -HCH - 74.5% of the initial content. The highest stability to microbial degradation had demonstrated  $\beta$ -HCH having the most symmetric molecule [2].



**Fig. 3. Destruction of HCH-isomers by *Stenotrophomonas maltophilia* IMV B-7288, %from initial content**

Notes: the percentage were calculated using data n=3



The great genetic and metabolic diversity within *S. maltophilia* makes it a “Wonder-bug” in the environment [7].

**Conclusion.** Our experimental data indicate that the selected strain *S. maltophilia* IMB B-7288 is a promising destructor of organochlorine pollutions and their derivatives and can be promising for using in environmental friendly technologies. In a liquid medium for 7 days of cultivation under aerobic conditions, the strain decomposed hexachlorocyclohexane isomers ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ ) by 61.6–82.1% of its initial content (20 mg/L).

УДК 504.064.46.681.3

**Н.А. Ямборко<sup>1</sup>, Г.О. Іутинська<sup>1</sup>, О.М. Дуган<sup>2</sup>,  
Д.О. Фарфоломєєва<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України  
вул. Акад. Заболотного, 154, Київ, 03143 Україна, e-mail: yamborkon@gmail.com  
<sup>2</sup>Національний технічний університет України «Київський політехнічний Інститут  
ім. Ігоря Сікорського», пр-т. Перемоги, 37, Київ, 03056, Україна

## **STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA IMB B-7288 ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ ДЕСТРУКТОР КОМПЛЕКСУ ІЗОМЕРІВ ГЕКСАХЛОРОЦИКЛОГЕКСАНУ В АЕРОБНИХ УМОВАХ**

### **Реферат**

**Метою** дослідження був пошук та ідентифікація перспективного мікроорганізму-деструктора хлорорганічного гексахлорциклогексану серед мікробних ізолятів, виділених із місць тотального пестицидного забруднення.

**Методи.** Лабораторну селекцію мікроорганізмів та дослідження здатності розкладати комплекс ізомерів гексахлорциклогексану ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  і  $\delta$ ) проводили мікробіологічними методами на твердих і рідких живильних середовищах з визначенням кількості розкладеного пестициду методом газової хроматографії, ідентифікацію відібраного ізоляту проводили із застосуванням поліфазного підходу методом API тестування та за допомогою сиквенсу фрагменту гену *16S rRNA*, з подальшим порівнянням одержаних результатів з базою даних GenBank за допомогою програми BLASTN. **Результати.** За ознакою стійкості до інсектициду гексахлорциклогексану виділено ізолят №6, ідентифікований як *Stenotrophomonas maltophilia* IMB B-7288, який на агаризованому середовищі проявляв стійкість до високої (1000 мг/л) концентрації пестициду. У рідкому середовищі за 7 діб культивування в аеробних умовах штамп розкладав ізомери гексахлорциклогексану ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  і  $\delta$ ) на 61,6–82,1% від його вихідного вмісту (20 мг/л). **Висновки.** Селекціонований штамп *Stenotrophomonas maltophilia* IMB B-7288 є ефективним деструктором ізомерів гексахлорциклогексану та його похідних і перспективним до застосування у природоохоронних технологіях.

**Ключові слова:** *Stenotrophomonas maltophilia*, гексахлорциклогексан, ліндан, біодеградація, сиквенс *16S rRNA*-аналіз.



УДК 504.064.46.681.3

Н.А. Ямборко<sup>1</sup>, Г.А. Іутинская<sup>1</sup>, А.М. Дуган<sup>2</sup>,  
Д.О. Фарфоломеева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины  
ул. Акад. Заболотного, 154, Киев, 03143 Украина, e-mail: yamborkon@gmail.com

<sup>2</sup>Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический Институт  
им. Игоря Сикорского», пр-т. Победы, 37, Киев, 03056, Украина

## ***STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* IMV B-7288 КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ДЕСТРУКТОР КОМПЛЕКСА ИЗОМЕРОВ ГЕКСАХЛОРИЦИКЛОГЕКСАНА В АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ**

### **Реферат**

**Целью** исследования был поиск и идентификация перспективного микроорганизма-деструктора хлорорганического инсектицида гексахлорциклогексана (ГХЦГ) среди микробных изолятов, выделенных из мест тотального загрязнения пестицидами. **Методы.** Лабораторную селекцию микроорганизмов и исследование способности разлагать комплекс изомеров ГХЦГ ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ ) проводили микробиологическими методами на твердых и жидких питательных средах с определением количества разложенного пестицида методом газовой хроматографии, идентификацию отобранного изолята проводили с применением полифазного анализа методом АРЕ тестирования и с последующим секвенсом фрагмента гена *16S rRNA*, с дальнейшим сравнением полученных результатов с базой данных GenBank с помощью программы BLASTN. **Результаты.** По признаку устойчивости к инсектициду ГХЦГ выделен изолят №6, идентифицированный как *Stenotrophomonas maltophilia* ИМВ B-7288, который в агаризованной среде проявлял устойчивость к высокой (1000 мг/л) концентрации пестицида. В жидкой среде за 7 суток культивирования в аэробных условиях штамм разлагал изомеры ГХЦГ ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ ) на 61,6–82,1% от исходного содержания (20 мг/л). **Выводы.** Селекционированный штамм *Stenotrophomonas maltophilia* ИМВ-7288 является эффективным деструктором изомеров гексахлорциклогексана и его производных и перспективен для использования в природоохранных технологиях.

**Ключевые слова:** *Stenotrophomonas maltophilia*, гексахлорциклогексан, линдан, биодеградация, секвенс *16S rRNA*-анализ

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Bhaganna P., Volkens R.J.M., Bell A., Kluge K., Timson D.J., McGrath J.W., Ruijsenaars H.J., Hallsworth J.E. Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells // *Microbial Biotechnology*. – 2010. – V.3, №6. – P. 701–716.
2. Chen Hao, Gao Bin, Wang Shengsen, Fang June Microbial Degradation of hexachlorocyclohexane (HCH) pesticides. // *Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste*. New York: 2015; 10.1201/b18218-8. – P. 181–209.



3. Dalgaard P. Introductory Statistics with R. – Springer Science. – 2008. – 370 p.
4. Gafni A., Lihl Ch., Gelman F., Elsner M., Bernstein A.  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{37}\text{Cl}$  Isotope fractionation to characterize aerobic vs anaerobic degradation of trichloroethylene // Environ. Sci. Technol. Lett. –2018. –V.5, №4. –P. 202–208.
5. Gren I., Wojcieszyn'ska D., Guzik U., Perkosz M., Hupert-Kocurek K. Enhanced biotransformation of mononitrophenols by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 in the presence of aromatic compounds of plant origin // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2010. –V.26.–P.289–295. doi:10.1007/s11274-009-0172.
6. Клочко В.В., Чугунова К.А., Авдеева Л.В. Полифазный таксономический анализ и биологически активные вещества штамма *Pseudomonas* sp. 2303 // Мікроб. журн. – 2018. – 80. №3. –P. 29-39.
7. Mukherjee P., Roy P. Genomic Potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in Bioremediation with an Assessment of Its Multifaceted Role in Our Environment //Frontiers in Microbiology. – 2016. – V.7, №967. –P.1-14.
8. Quintero JC, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. Effect of surfactants on the soil desorption of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers and their anaerobic biodegradation. J Chem. Technol Biotechnol. 2005, 80: 1005–1015.
9. Сиделёв С.И. Математические методы в биологии и экологии. Введение в элементарную биометрию: учебное пособие. – Ярославль: Ярославский Государственный университет, 2012: 140 с.
10. Strategies for Bioremediation of Organic and Inorganic Pollutants. Editors Fuentes M.S., Colin V.L., Saez J.M.:CRC Press, 2018. – 304 p.
11. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов/ Под ред. В.К. Шильниковой . – М.: Дрофа, 2004.– 256 с.
12. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, EPA Method 8120 A. – Washington: DC, 3rd Edition, U.S. EPA, – 1990. – P. 456.
13. UN-EC Technical Scoping Mission Kalush / Report, 2010/ UNEP/OCHA // <http://ochaonline.un.org/ochaunep>.
14. Vogel T.M., Criddle C.S., McCarty P.L. Transformation of halogenated aliphatic compounds// Environ. Sci. Technol. – 1987. – V.21. –P.722–736.
15. Ямборко Н.А., Іутинська Г.О., Свистунова І.В. Біодеструкція ізомерів гексахлорциклогексану природною і штучно створеною мікробними асоціаціями // Мікроб. журн. – 2018.– 80, №5. – С.15–24.

### References

1. Bhaganna P, Volkens RJM, Bell A, Kluge K, Timson DJ, McGrath JW, Ruijsse-naars HJ, Hallsworth JE. Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells. Microbial Biotechnology. 2010; 3 (6): 701–716.
2. Chen Hao, Gao Bin, Wang Shengsen, Fang June, Microbial Degradation of hexa-chlorocyclohexane (HCH) pesticides, advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste. 2015; 10.1201/b18218-8: 181-209.
3. Dalgaard P Introductory Statistics with R. – Springer Science. – 2008. – 370 p.



4. Gafni A, Lihl Ch, Gelman F, Elsner M, Bernstein A.  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{37}\text{Cl}$  Isotope fractionation to characterize aerobic vs anaerobic degradation of trichloroethylene. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2018; 5 (4): 202–208.
5. Gren I, Wojcieszyn'ska D, Guzik U, Perkosz M, Hupert-Kocurek K Enhanced bio-transformation of mononitrophenols by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 in the presence of aromatic compounds of plant origin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 26: 289–295. doi:10.1007/s11274-009-0172.
6. Klochko VV, Chugunova KO, Avdeeva LV Polyphasic taxonomic analysis and biologically active substances of strain *Pseudomonas* sp. 2303. *Microbiological Journal.* 2018; 80 (3): 29-39.(Russian).
7. Mukherjee P, Roy P. Genomic Potential of *Stenotrophomona smaltophilia* in Bio-remediation with an Assessment of Its Multifaceted Role in Our Environment. *Frontiers in Microbiology.* 2016; 7 (967):1-14.
8. Quintero JC, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. Effect of surfactants on the soil de-sorption of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers and their anaerobic biodegradation. *J Chem. Technol Biotechnol.* 2005, 80: 1005–1015.
9. Sidelev SI. *Mathematical Methods in Biology and Ecology: Introduction to Elementary Biometry: A Training Manual.* - Yaroslavl: Yaroslavl State University, 2012: 140 p. (in Russian).
10. *Strategies for Bioremediation of Organic and Inorganic Pollutants.* Editors Fuentes MS, Colin VL, Saez JM / CRC Press, 2018:304.
11. ITepper EZ, Shilnikova VK, Pereverzeva GI Workshop on Microbiology: Text-book for universities. Ed. VC. Shilikova. M.: Bustard, 2004: 256. (Russian).
12. *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, EPA Method 8120 A;* Washington: DC, 3rd Edition, U.S. EPA 1990: 456.
13. UN-EC Technical Scoping Mission Kalush / Report, 2010/ UNEP/OCHA // <http://ochaonline.un.org/ochaunep>.
14. Vogel TM, Criddle CS, McCarty PL. Transformation of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 1987; 21:722–736.
15. Yamborko NA, Iutynska GO, Svistunova IV Biodestruction of hexahorocyclohex-ane isomers by natural and artificial created microbial associations. *Microbiological Journal.* 2018; 80 (5):15–24. (Ukrainian).

Стаття надійшла до редакції 11.06.2020 р.





**Н.В. Коротаєва, Н.В. Ліманська, І.В. Страшнова,  
В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,  
e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua

## **ВПЛИВ БАКТЕРІЙ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU87 НА РОЗВИТОК БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ НА РОСЛИНАХ ВИНОГРАДУ**

**Метою** даного дослідження було встановити вплив бактерій *L. plantarum* ONU87 на розвиток бактеріального раку на рослинах винограду за штучної інокуляції *R. radiobacter* C58. **Методи.** Інокуляцію чубуків винограду проводили культурами фітопатогенних ризобії та бактеріями штаму *L. plantarum* ONU87. Усього було використано 295 чубуків винограду сорту Піно чорний. Чубуки зрізаними базальними кінцями поміщали у суспензії бактерій або у контрольні рідини, витримували годину, а потім висаджували і залишали в умовах теплиці для вкорінення. Через 30 днів проводили оцінку морфологічних показників винограду. Через 90 днів з оброблених чубуків виділяли ризобії та виявляли їх патогенність методом ПЛР. **Результати.** Встановлено, що обробка бактеріями *L. plantarum* ONU87 за штучного інфікування чубуків винограду *R. radiobacter* C58 призводила до зменшення на 76,8% кількості заражених рослин та стимулювала ріст і розвиток винограду: спостерігалося підвищення кількості життєздатних чубуків у порівнянні з інфікованими фітопатогенними ризобіями на 18,8%, а кількість бруньок, що розпустилися, збільшилася на 21,5–33,9%. **Висновок.** Обробка бактеріями штаму *L. plantarum* ONU87 за штучного інфікування винограду *R. radiobacter* C58 призводить до значного зменшення кількості чубуків, у які потрапив збудник бактеріального раку (на 76,8%), та покращує стан піддослідних рослин винограду за показниками життєздатності оброблених чубуків та бруньок, що розпустилися.

*Ключові слова:* бактеріальний рак рослин, *Rhizobium radiobacter*, антагоністична активність, *Lactobacillus plantarum*.

Однією з стратегій захисту рослин, сучасною і безпечною для навколишнього середовища, є біологічний контроль, який передбачає використання мікроорганізмів із корисними властивостями [13]. Введення у ґрунт та на рослинні поверхні бактерій-антагоністів дозволяє ефективно пригнічувати ріст фітопатогенів, а у багатьох випадках – також покращувати розвиток рослини завдяки стимулювальним речовинам, які синтезуються бактеріями. Біологічний контроль постає все більш привабливим через накопичення у навколишньому середовищі токсичних хімічних речовин, які активно застосовуються у сільському господарстві [2]. В Україні та багатьох країнах світу поширеними



хворобами рослин, які наносять значні збитки аграрному комплексу, є бактеріальний рак [1]. Проти збудників бактеріального раку – *Rhizobium vitis* та *R. radiobacter* у біологічному контролі застосовуються бактерії – представники різноманітних родів – авірулентні *R. radiobacter* [13], *R. vitis* [6], *Pseudomonas sp.* [4]. Широкий спектр мікроорганізмів, що пригнічуються молочнокислими бактеріями роду *Lactobacillus*, і те що вони відносяться до групи з найвищим рівнем безпеки для людини та навколишнього середовища, робить зазначені антагоністи привабливими не тільки з точки зору захисту слизових оболонок людини і тварин, але й для захисту рослин [9, 12, 15]. Так, відоме застосування молочнокислих бактерій проти *Ralstonia solanacearum* [11], *Xanthomonas campestris* [3], *Fusarium* [6]. Нами було виявлено антагоністичний ефект бактерій штаму *Lactobacillus plantarum* ONU87 проти збудника бактеріального раку *R. radiobacter* на тест-моделях рослин: коренеплоди моркви (*Daucus carota subsp. sativus L.*) і каланхое (*Kalanchoe daigremontiana Mill.*) [10].

Метою даного дослідження було встановити вплив бактерій *L. plantarum* ONU87 на розвиток бактеріального раку на рослинах винограду за штучної інокуляції *R. radiobacter*.

#### Матеріали і методи дослідження

В роботі використано фітопатогенний штам *Rhizobium radiobacter* C58, отриманий з пухлин вишні (*Prunus sp cv Montmorency*), який характеризується високою вірулентністю [5], а також штам антагоніст *Lactobacillus plantarum* ONU87 з колекції кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, виділений з кисломолочних продуктів домашнього виробництва півдня України. Бактерії *R. radiobacter* C58, для моделювання інфекційного процесу бактеріального раку рослин, культивували 24 год у рідкому середовищі LB при 28 °C і використовували для подальших досліджень у концентрації 10<sup>8</sup> КУО/мл. Молочнокислі бактерії *L. plantarum* ONU87 вирощували 24 год у рідкому середовищі MRS при 37 °C і використовували для подальших досліджень у концентрації 10<sup>9</sup> КУО/мл.

Для вивчення впливу бактерій *L. plantarum* ONU87 на розвиток бактеріального раку проводили на рослинах винограду. Усього було використано для зараження 295 чубуків винограду сорту Піно чорний, який у кліматичних умовах України є сприйнятливим до ураження бактеріальним раком. Чубуки вимочували впродовж однієї години у воді, живильних середовищах як контролях, та у суспензіях бактерій. Цей процес імітував вимочку лози перед щепленням або садінням, як це практикується у розсадницьких господарствах. Чубуки зрізаними базальними кінцями поміщали у суспензії бактерій або у контрольні рідини, витримували годину, а потім відразу ж висаджували у комерційний ґрунт з високим вмістом торфу і залишали в умовах теплиці для вкорінення.

За негативні контролю було обрано: вода нестерильна, рН 6,0; вода нестерильна, рН 4,0; середовище MRS, рН 4,0; суміш середовищ MRS: LB, рН 5,5–6,0. Позитивні контролю – бактеріальна культура *R. radiobacter* C58; суспензія *L. plantarum* ONU87. Дослідний варіант – суміш суспензій *L. plantarum*



ONU87 та *R. radiobacter* C58 у співвідношенні 1:1. Через 30 днів проводили оцінку морфологічних показників винограду, для чого обчислювали частку пагонів, що вижили та частку бруньок, що розпустилися. Дані у графічному вигляді оформлювали в Microsoft Word Excel, статистичний аналіз виконували в програмі R 3.6.0 з заданим рівнем значущості не менше 95%.

Через 90 днів з оброблених чубуків виділяли збудники бактеріального раку. Для виділення, яке проводили за методом Lehoczky (1968), використовували середовище Roy&Sasser (1983). Частину чубуків розрізали на дрібні фрагменти (приблизно 0,5 см у довжину) і вимочували у стерильній воді протягом 30 хв на шейкері за 200–250 об/хв за кімнатної температури. З кожного зразка здійснювали посів 50 мкл суспензії на середовище Roy&Sasser з 1,5% агару. ДНК бактерій, які вирости на середовищі виділяли методом теплового лізису. У наведеній методиці ПЛР застосовували наступні пари праймерів до послідовності гену *ipt*: 5' – GAT CG(G/C) GTC CAA TG(C/T) TGT- 3' і 5' –GAT ATC CAT CGA TC(T/C) CTT – 3'. Готували реакційну суміш для проведення класичної ПЛР. Склад реакційної суміші для проведення класичної ПЛР: 7,8 мкл дейонізованої води; 2 мкл 10x ПЛР буфера; 2,0 мкл 2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (200 мкМ); 1,0 мкл кожного із пари 10 мМ праймерів до послідовності гену *ipt* (0,5 мкМ); 0,8 мкл 50 мМ Mg<sup>++</sup> (2 мМ Mg<sup>++</sup>); 0,4 мкл Tag – полімерази, 5 Од/мкл (2 Од). Наведені кількості на одну реакцію у об'ємі 20 мкл. Ампліфікацію проводили згідно наступних параметрів: 1 хв денатурації при 94 °С, 1 хв відпалу при 52 °С, 1 хв елонгації при 72 °С, і кількість таких циклів дорівнювала 40. У першому циклі час денатурації збільшено до 3 хв, а у останньому циклі час елонгації збільшено до 7 хв порівняно з методикою Haas et al (1995). Облік результатів ПЛР проводили за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі. Результати ПЛР оцінювали, порівнюючи розмір ампліконів з розміром маркерів молекулярної ваги.

### Результати дослідження та їх обговорення

Встановлено, що стан чубуків винограду, які підлягали вкоріненню після обробки лактобацилами, різнився залежно від варіанту досліду та його показники вказували на позитивний ефект молочнокислих бактерій у пригніченні розвитку бактеріального раку рослин (табл., рис. 1).

Рослинний матеріал з насаджень Одеської області характеризувався доброю приживлюваністю, оскільки відсоток життєздатних чубуків, які були вимочені у воді, на момент обліку результатів становив 100% (рис. 2).

Чубуки, вимочені у суспензії лактобацил, також характеризувалися 100% виживанням. Вимочування у суспензії штаму *R. radiobacter* C58 призвело до значного зменшення кількості чубуків, що прижилися – 76,2%, тобто зменшення на 23,8% (розрахунковий коефіцієнт критерію Стьюдента  $t = -21,1$ , при  $p < 2.2e-16$ ) (табл., рис. 2). Це свідчить про негативний вплив метаболітів фітопатогенних ризобій на життєздатність чубуків винограду.

Як видно з рисунка 2, застосування лактобацил для захисту рослин призвело до значного покращення показника життєздатності оброблених чубуків – кількість чубуків, що вижили, складала 95% (порівняно з контролем, розрахунковий коефіцієнт критерію Стьюдента склав  $t = -0,8$ ,  $p = 0,42$ ). Підвищення



кількості життєздатних чубуків у порівнянні з інфікованими фітопатогенними ризобіями склало 18,8% ( $t = 14,3$ , при  $p < 2,2e-16$ ).

Таблиця

Показники стану чубуків винограду після обробок  
*R. radiobacter* C58 і лактобацилами

Варіант дослідю	Кількість життєздатних пагонів, %	Кількість бруньок, що розпустилися, %	Середня довжина пагонів, см	Середня площа листка, см <sup>2</sup>
Вода pH 6,0	100±0,0	54,3±5,2	11,8±3,3	6,7±0,7
<i>L. plantarum</i> ONU87	100±0,0	54,8±6,3	14,9±4,0	8,9±1,1
<i>R. radiobacter</i> C58	76,2±6,5	42,35±5,3	12±2,8	7,0±0,8
Суміш <i>L. plantarum</i> ONU87: <i>R. radiobacter</i> C58	95±3,4	76,3±6,8	12,4±3,4	9,3±1,1
Вода, pH 4,0	100±0,0	54,5±5,2	10,9±3,2	5,6±0,6
MRS, pH 4,0	91±4,3	59,0±6,1	8,3± 3,4	5,8± 1,2
MRS: LB, pH 5,5 – 6,0	80±6,3	46±8,7	11,6± 3,6	5,6±0,6



А Б В Г Е Є Ж

**Рис. 1. Чубуки винограду на 32 день після постановки експерименту.** Зліва направо: А – вода (pH 6,0), Б – *L. plantarum* ONU87, В – суміш *L. plantarum* ONU87: *R. radiobacter* C58, Г – живильне середовище MRS (pH 4,0), Е – суміш живильних середовищ MRS і LB, Є, Ж – *R. radiobacter* C58

**Fig. 1. Grape shoots on the 32 day after the experiment.**

From the left to the right: A – water (pH 6.0), B – *L. plantarum* ONU87, B – a mixture of *L. plantarum* ONU87: *R. radiobacter* C58, D – medium MRS (pH 4.0), E – a mixture of MRS and LB, E, F – *R. radiobacter* C58

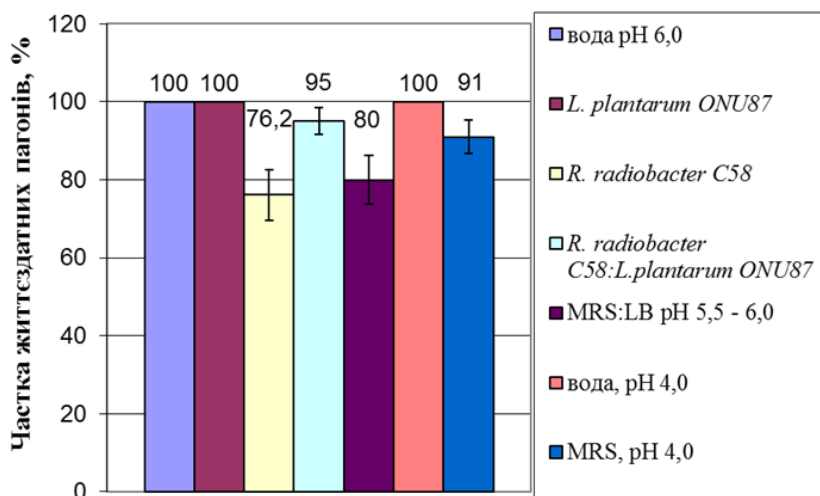


Рис. 2. Вплив на життєздатність пагонів сорту Піно чорний різних дослідних обробок лактобацилами і ризобіями

Fig. 2. The viability effect of Pinot Black shoots after experimental treatment with Lactobacilli and Rhizobia

Встановлено, що кількість життєздатних пагонів у варіантах з вимочуванням у живильних середовищах ( $91 \pm 4,3\%$  та  $80 \pm 6,3\%$ ) була навіть дещо меншою порівняно з вимочуванням у воді (розрахований критерій Ст'юдента при порівнянні контролю і середовища MRS, pH 4,0 склав  $t = 17,9$  при  $p < 2.2e-16$ ; розрахований критерій Ст'юдента при порівнянні контролю і суміші середовищ MRS: LB, pH 5,5 – 6,0 склав  $t = 21,4$  при  $p < 2.2e-16$ ) (табл.), і це свідчить про те, що позитивний вплив на рослини мали саме бактеріальні клітини *L. plantarum* ONU87, а не інші його елементи, такі як складові живильного середовища (рис. 2).

Низький pH середовищ також не має статистичного впливу на стан чубуків при їх вимочуванні протягом години, як це видно з даних, отриманих при обробці водою з pH 4,0 (розрахований критерій Ст'юдента становив  $t = -0,12$  при  $p = 0,91$ ) (рис. 2). Кислотність води взагалі ніяк не вплинула на життєздатність чубуків при вимочуванні протягом години, і це є дуже доброю ознакою, оскільки виноград не виносить низьких pH, але за такого нетривалого терміну обробки при низькому pH чубуки не ушкоджуються, і цей час є достатнім для захисту рослин від бактеріального раку за допомогою добових культур *L. plantarum* ONU87.

Кількість бруньок, що розпустилися, у чубуків, заражених патогенними ризобіями, достовірно відрізнявся від позитивного контролю на 12% (розрахований критерій Ст'юдента становив  $t = 12,1$  при  $p < 2.2e-16$ ) (рис. 3), що свідчило про згубний вплив токсичних речовин збудників бактеріального раку на стан обробленого чубука, скоріш за все, зумовлений некрозами у судинах рослин, утворення яких пригнічує ефективність руху живильних речовин та води по ксилемі та флоемі.

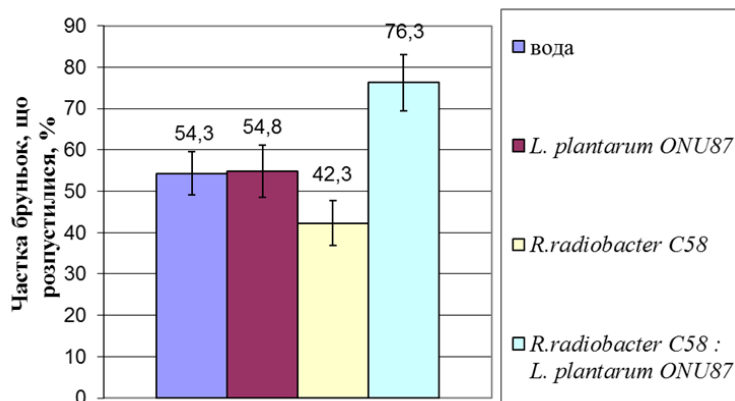


Рис. 3. Вплив інокуляції чубуків бактеріями на кількість бруньок, що розпустилися

Fig. 3. The effect of inoculation the bacteria on the number of buds that bloomed

Дослідниками показано, що високі концентрації бактерій *R. vitis* і *R. radiobacter* (приблизно  $10^6$ – $10^8$  КУО/мл) є високо некротичними для паренхіми ксилеми винограду. У відповідь на інокуляцію такою дозою фітопатогену спостерігається [10] затримка росту винограду, слабкий ріст, значно підвищується відсоток загибелі чубуків та прищеплених рослин. Подібний некрогенез лімітує утворення пухлин на винограді. Існують гіпотези про те, що основним чинником впливу на рослинні клітини є підвищена кількість ауксину, а також полігалактуроназа, яка руйнує клітинні стінки [2].

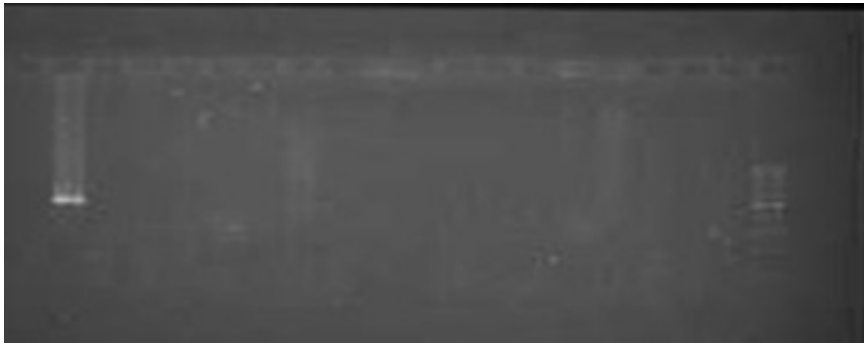
Що стосується обробок лактобацилами, то, як видно з рисунка 3, одночасна присутність в суміші, якою обробляють рослини, бактерій збудника бактеріального раку і лактобацил призводить до статистично значного підвищення кількості бруньок, що розпустилися (збільшення на 22% від негативного контролю, розрахований критерій Стюдента становив  $t = 26,56$  при  $< 2.2e-16$ ). Такий значний стимулювальний ефект суміші є неочікуваним і свідчить про наявність у бактерій суміші стимулювальної активності. Поодиночі ризобії і лактобацили не спричиняють такого впливу. Це явище описано нами вперше, і може бути пояснене декількома причинами.

По-перше, ймовірно, що загибель клітин фітопатогенних ризобій під впливом антагоністичних речовин лактобацил супроводжується руйнуванням клітин і виходом речовин, що мають стимулювальну для рослин дію, але не секретуються у середовище. По-друге лактобацили можуть споживати речовини, що вивільняються із загиблих клітин фітопатогенних ризобій, і у відповідь на споживання нових джерел вуглецю та амінокислот виділяти ширший спектр метаболітів, що стимулюють ріст. По-третє, можливо, що стимулювальній активності лактобацил повною мірою заважає накопичена підвищена концентрація перекису водню – звичайного метаболіту молочнокислих бактерій. У нашому випадку каталаза ризобій, навіть із зруйнованих клітин, може зменшувати рівень перекису водню до рівня, нетоксичного для рослини, і таким чином нівелювати вплив цієї сполуки. Натомість, стимулювальний



ефект інших метаболітів лактобацил вже не маскується негативним впливом перекису.

Через три місяці з оброблених чубуків проводили виділення збудників бактеріального раку за методом Lehoszky (1968). ПЛР-аналіз (рис. 4), проведений з ДНК бактерій, виділених з судин, дозволив виявити чубуки, в які проник збудник *R. radiobacter* C58 (табл.).



**Рис. 4. Електрофореграма продуктів ПЛР з праймерами до послідовностей *ipt* патогенних ризобій:**

1 – *ipt*-позитивний штамп, 2–19 – непатогенні штами, 20 – маркери молекулярної маси (1000 – 100 п.о.)

**Fig. 4. The electrophoregram of the of PCR products with *ipt* gene of pathogenic rhizobia:**  
1 – *ipt*-positive strain, 2–19 – non-pathogenic strains, 20 – molecular weight markers (1000–100 bp)

Відсоток інфікованих чубуків, який спостерігався у варіанті обробок сумішами *R. radiobacter* C58: *L. plantarum* ONU87 становив 23,2% та був значно меншим, ніж у чубуків інфікованих патогенними ризобіями (позитивний контроль), який становив 100%.

Отже, отримані результати показали, що обробка бактеріями штаму *L. plantarum* ONU87 за штучного інфікування винограду *R. radiobacter* C58 призводить до значного зменшення кількості чубуків, у які потрапив збудник бактеріального раку (на 76,8%), та покращує стан піддослідних рослин винограду за показниками життєздатності оброблених чубуків та бруньок, що розпустилися.

**N.V. Korotaeva, N.V. Limanska, I.V. Strashnova, V.O. Ivanytsia**

Odesa National I.I. Mechnykov University,  
2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine,  
e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua

## **EFFECT OF LACTOBACILLUS PLANTARUM ONU87 ON THE DEVELOPMENT OF CROWN GALL IN GRAPE**

### **Summary**

*The aim of this research was to study the influence of *L. plantarum* ONU87 on the development of crown gall infection in grape plants by artificial inoculation of *R. radiobacter* C58. **Methods.** Grape shoots were inoculated by pathogenic and antagonistic cultures. A total of 295 Pinot Black grape shoots were used. The cut off basal ends of grape shoots were placed into bacterial suspensions or into control liquids, kept for an hour and then immediately planted and left in a greenhouse for rooting. The morphological parameters of the grapes were evaluated in 30 days. In 90 days, rhizobia were isolated from the treated grape shoots and their pathogenicity was detected by PCR. **Results.** It was established that the treatment of grape shoots, previously artificially infected with *R. radiobacter* C58, by the *L. plantarum* ONU87 strain reduced the amount of infected samples by 76.8% and stimulated growth and development of grapes. An increase in the number of viable grape shoots reached 18.8% in comparison with the ones infected with phytopathogenic rhizobia. The number of buds that bloomed increased by 21.5–33.9%. **Conclusions.** The obtained results, the better condition of the experimental plants treated by *L. plantarum* ONU87 and the absence of negative effects of the large numbers of the introduced microbiota, allow to consider the lactobacilli treatment as a way to significantly reduce the infection of grape shoots with pathogenic rhizobia during their cultivation.*

*Key words: crown gall, R. radiobacter, antagonism, L. plantarum.*

**Н.В. Коротаєва, Н.В. Ліманська, І.В. Страшнова,  
В.А. Іваниця**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
ул. Дворянська, 2, Одеса, 65082  
e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua

## **ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ *LACTOBACILLUS PLANTARUM ONU87* НА РАЗВИТИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА НА РАСТЕНИЯХ ВИНОГРАДА**

### **Реферат**

*Целью данного исследования было установить влияние бактерий *L. plantarum* ONU87 на развитие бактериального рака на растениях винограда при искусственном инфицировании бактериями штамма *R. radiobacter* C58. **Методы.** Исследования проводили на побегах винограда, которые инокулировали культурами фитопатогенных ризобий и бактериями*





*L. plantarum* ONU87. Всего было использовано 295 стеблей винограда сорта Пино Черный. Побеги срезанными базальными концами помещали и вымачивали в течение 1 часа в суспензиях бактерий или в контрольных жидкостях, а потом сразу высаживали в тепличные условия. Через 90 дней с обработанных побегов выделяли ризобии с последующим выявлением их патогенности методом ПЦР. **Результаты.** Установлено, что обработка бактериями *L. plantarum* ONU87 при искусственном инфицировании побегов винограда *R. radiobacter* C58 уменьшила на 76,8% количество зараженных растений и стимулировала рост и развитие винограда. Наблюдалось повышение количества жизнеспособных побегов на 18,8%, а количество распустившихся почек увеличилось на 21,5–33,9%. **Вывод.** Полученные результаты показали, что обработка бактериями штамма *L. plantarum* ONU87 при искусственном инфицировании *R. radiobacter* C58 значительно уменьшает количество побегов винограда, в которые внедряется возбудитель бактериального рака растений (на 76,8%), а также улучшает состояние растений винограда по показателям жизнеспособности побегов и распустившихся почек.

*Ключевые слова:* бактериальный рак растений, *Rhizobium radiobacter*, антагонистическая активность, *Lactobacillus plantarum*.

## References

1. Milkus BN, Limanska NV et al. Viral and bacterial ailments to grapes. Odesa: 2012. 157. (in Ukrainian).
2. Asghari S, Harighi B, Ashengroph M et al. Induction of systemic resistance to *Agrobacterium tumefaciens* by endophytic bacteria in grapevine. *Plant Pathol.* 2020; 69: 827-837. <https://doi.org/10.1111/ppa.13175>.
3. Dalirsaber JM, Khosro I, Ghasemi MF, Tabrizi SSKh. Antagonism of *Lactobacillus* species against *Xanthomonas campestris* isolated from different plants. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences.* 2012; 9: 480-484.
4. Dandurishvili N, Toklikishvili N, Ovadis M, Eliashvili P, Giorgobiani, N, Keshelava R, Tediashvili M, Vainstein A, Khmel I, Szegeedi E, Chernin L. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *Journal of applied microbiology.* 2011; 110: 341-352. 10.1111/j.1365-2672.2010.04891.x.
5. Goodner B et al. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science.* 2001; 294: 2323–2328.
6. Herlache TC, Triplett EW. Expression of a crown gall biological control phenotype in an avirulent strain of *Agrobacterium vitis* by addition of the trifoliotoxin production and resistance genes. *BMC Biotechnology.* 2002; 2 (2):1-7 <https://doi.org/10.1186/1472-6750-2-2>
7. Hoda AH, Yomna AM, Shadia MA-A. *In vivo* efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant. *Life Science J.* 2011; 8: 462-468.
8. Kang S, Radhakrishnan R, You Y, Khan A, Park J, Lee S and Lee I. Cucumber performance is improved by inoculation with plant growth-promoting



- microorganisms. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 2014; 65: 36-44. DOI: 10.1080/09064710.2014.960889.
9. Limanska N, Ivanytsia T, Basiul O et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings. *Acta Physiol Plant*. 2013; 35: 1587-1595. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1200-y>
  10. Limanska NV, Korotaeva NV, Yamborko GV, Ivanytsia VO. Effect of *Lactobacillus plantarum* on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter*. *Microbiology&Biotechnology*. 2014; №1(25): 8-18.
  11. Lwin M, Ranamukhaarachchi SL. Development of biological control of *Ralstonia solanacearum* through antagonistic microbial populations. *Int. J. Agric. Biol.* 2006; 8(5): 657-660.
  12. Roselló G, Bonaterra A, Francés J et al. Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic *Lactobacillus plantarum*. *Eur J Plant Pathol*. 2013; 137: 621–633. doi:10.1007/s10658-013-0275-7
  13. Sharma A, Diwevidi VD, Singh S, Pawar KK, Jerman M, Singh LB, Singh S, Srivastawa D. Biological Control and its Important in Agriculture. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*. 2013; 4(3): 175-180.
  14. Shrestha A, Kim BS, Park DH. Biological control of bacterial spot disease and plant growth-promoting effects of lactic acid bacteria on peppe. *Biocontrol Science and Technology*. 2014; 24(7): 763-779. DOI: 10.1080/09583157.2014.894495
  15. Zamani M, Soleimani S, Sheikh M. Biocontrol of Gray mold disease on strawberry fruit by integration of *Lactobacillus plantarum* A7 with ajwain and cinnamon essential oils. *Journal of Food Science*. 2013; 78: 1582-1588. doi:10.1111/1750-3841.12242.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Мілкус Б.Н., Ліманська Н.В., Жунько І.Д. та ін. Вірусні та бактеріальні хвороби винограду. – Одеса. – 2012. – 157 с.
2. Asghari S., Harighi B., Ashengroph M. et al. Induction of systemic resistance to *Agrobacterium tumefaciens* by endophytic bacteria in grapevine. // *Plant Pathol.* – 2020. – 69. – P. 827–837.
3. Dalirsaber J.M., Khosro I., Ghasemi M.F., Tabrizi S.S.Kh. Antagonism of *Lactobacillus* species against *Xanthomonas campestris* isolated from different plants. // *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences.* – 2012. – 9. – P. 480–484.
4. Dandurishvili N., Toklikishvili N., Ovadis M., Eliashvili P., Giorgobiani N., Keshelava R., Tediashvili M., Vainstein A., Khmel I., Szegedi E., Chernin L. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. // *Journal of applied microbiology.* – 2011. – 110. – P. 41-352.
5. Goodner B. et al. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. // *Science.* – 2001. – 294. – P. 2323–2328.
6. Herlache T.C., Triplett E.W. Expression of a crown gall biological control



- phenotype in an avirulent strain of *Agrobacterium vitis* by addition of the trifolixotoxin production and resistance genes. // BMC Biotechnology. – 2002. – V. 2 N 2. – P. 1–7.
7. Hoda A.H., Yomna A.M., Shadia M.A-A. In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant. Life // Science J. – 2011. – 8. – P. 462–468.
  8. Kang S., Radhakrishnan R., You Y., Khan A., Park J., Lee S. and Lee I. Cucumber performance is improved by inoculation with plant growth-promoting microorganisms. // Acta Agriculturae Scandinavica. – 2014. – 65. – P. 36–44.
  9. Limanska N., Ivanytsia T., Basiul O. et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings. // Acta Physiol Plant. – 2013. – 35. – P. 1587–1595.
  10. Limanska N.V., Korotaeva N.V., Yamborko G.V., Ivanytsia V.O. Effect of *Lactobacillus plantarum* on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter*. // Мікробіологія і біотехнологія. – 2014. – №1(25) . – P. 8–18.
  11. Lwin M., Ranamukhaarachchi S.L. Development of biological control of *Ralstonia solanacearum* through antagonistic microbial populations. // Int. J. Agricult. Biol. – 2006. – 8(5) . – P. 657–660.
  12. Roselló G., Bonaterra A., Francés J et al. Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic *Lactobacillus plantarum*. // Eur J Plant Pathol . – 2013. –137. – P. 621–633.
  13. Sharma A., Diwevidi V.D., Singh S., Pawar K.K., Jerman M., Singh L.B., Singh S., Srivastawa D. Biological Control and its Important in Agriculture. // International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research. –2013. –4(3) . – P. 175–180.
  14. Shrestha A., Kim B.S., Park D.H. Biological control of bacterial spot disease and plant growth-promoting effects of lactic acid bacteria on peppe. Biocontrol Science and Technology. –2014. –24(7) . – P. 763–779.
  15. Zamani M., Soleimanian S., Sheikh M. Biocontrol of Gray mold disease on strawberry fruit by integration of *Lactobacillus plantarum* A7 with ajwain and cinnamon essential oils. // Journal of Food Science. – 2013. –78. – P. 1582–1588.

Стаття надійшла до редакції 09.08.2020 р.



**Л.О. Максименко**

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,  
тел.:+38(044)526 94 24, e-mail: maksymenko.l.a@gmail.com

**МОРФОЛОГО-СТРУКТУРНІ, КІЛЕРНІ  
ТА СЕРОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ  
МАКРОМОЛЕКУЛЯРНИХ БАКТЕРІОЦИНІВ  
*PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM SUBSP.  
CAROTOVORUM* ТА ЇХ СПОРІДНЕНІСТЬ  
З БАКТЕРІОФАГОМ ZF40**

**Мета.** Визначення спорідненості між білковими компонентами макромолекулярних бактеріоцинів (MCTV), виділених з різних природних ізолятів *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* і бактеріофага ZF40. **Методи.** Бактеріоцини *P. carotovorum* отримували індукцією налідиксовою кислотою. Суміш каротоворицинів розділяли ультрацентрифугуванням. Електронномікроскопічні дослідження бактеріоцинів проводили за допомогою мікроскопа JEOL1400. Бактеріофаг ZF40 виділяли методом злитного лізису. Кілерну активність MCTV і бактеріофага ZF40 визначали за допомогою популяційних дисоціантів RC 5297 і RC 5195. Серологічну спорідненість білкових компонентів MCTV і бактеріофага ZF40 визначали за допомогою отриманих до зазначених структур відповідних кролячих антисироваток. **Результати.** Фітопатогенні бактерії *P. carotovorum* в результаті індукції налідиксовою кислотою, продукують множину макромолекулярних бактеріоцинів. Вони проявляють антимікробну дію відносно різних штамів бактерій *P. carotovorum* та *Escherichia coli*. Електронномікроскопічні дослідження очищених фракцій MCTV з ізолятів *P. carotovorum* різних областей України (Б1-Б26) показали, що вони мають вигляд хвостових відростків бактеріофагів, а також сферичних часток різного діаметра. Білковий склад MCTV різних ізолятів *P. carotovorum* може відрізнятися мінорними фракціями пептидів. За допомогою кролячої антисироватки, одержаної до MCTV J2 виявлені серологічно споріднені білки у складі бактеріофага ZF40. Методом імуноблотингу з використанням антисироватки, одержаної до структурних білків бактеріофага ZF40, виявлені серологічно споріднені білки у складі MCTV/J2 і бактеріофага ZF40 з молекулярною масою 72,66, 39 і 24 кД. Обробка суміші MCTV кролячою антисироваткою до бактеріофагу ZF40, призводить до втрати їх кілерної активності. **Висновки.** MCTV, отримані з лізатів нових ізолятів бактерій *P. carotovorum*, виділених в Україні, представляють собою велику множину, відрізняються за розміром і мають різні морфолого-структурні показники. Вони мають у своєму складі серологічно споріднені білки з білковими компонентами бактеріофага ZF40. Отримані факти підтверджують фагову природу макромолекулярних бактеріоцинів. **Ключові слова:** *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, макромолекулярні бактеріоцини, бактеріофаг ZF40, білки, серологічна спорідненість.



Актуальним завданням для сучасності є пошук нових природних антибіотичних речовин. Фітопатогенні бактерії *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* здатні продукувати частки з антибактеріальними властивостями. Під дією на бактеріальні клітини певних індукторів, наприклад, налідиксової кислоти, мітоміцину С, УФ-випромінювання та ін., бактерією продукуються дефектні частки – макромолекулярні бактеріоцини (МСТV) і низькомолекулярні каротоворицини (СТV) [5]. При цьому повноцінні бактеріофаги не утворюються. Наявність бактеріоцинів відображає дефектно-лізогенний стан цієї бактерії. Відомо, що клітини одного й того ж штаму бактерій можуть нести декілька різних типів фагових хвостових відростків і фагових головок [6]. Велика увага приділяється вивченню їх кілерної активності відносно родини *Enterobacteriaceae*, що в подальшому може дати змогу використання їх властивостей в народному господарстві. Утворення більшості високо- і низькомолекулярних кілерних часток регулюється SOS-системою клітини-хазяїна [6]. Раніше дослідження морфології часток МСТV показали, що їх структура подібна хвостовому відростку бактеріофагів родини *Myoviridae* [10]. Відомо, що макромолекулярні бактеріоцини починають реалізувати властиву їм кілерну активність завдяки прикріпленню до рецепторів на клітинній стінці бактерій і руйнуванню оболонки клітини. Бактеріофаги, на відміну від бактеріоцинів, вводять в клітину власну ДНК і відроджують свою популяцію. Вид помірно-го бактеріофага *Pectobacterium carotovorum* – ZF40 був вперше виділений і описаний Ф.І.Товкачем [7].

У бактеріофага ZF40 наряду з морфологічними властивостями, аналіз сиквенса генома показав, що він є типовим представником бактеріофагів родини *Myoviridae* (морфотип А1) [7, 9]. В літературі є свідчення про спорідненість бактеріоцинів і бактеріофагів [13]. Так, методом імуноблоту показано, що за допомогою сироватки одержаної до білків бактеріофага PS17, виявляються фагові білки у складі піоцина R2 *Pseudomonas aeruginosa* [13]. В зв'язку з цим метою нашого дослідження було визначення спорідненості між білковими компонентами макромолекулярних бактеріоцинів (МСТV), виділених з різних природних ізолятів *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* і бактеріофага ZF40.

### Матеріали і методи

Для виділення і дослідження властивостей бактеріоцинів в даній роботі використовували ізоляти штамів пектолітичних фітопатогенних бактерій, наведених в таблиці.

Ізоляти фітопатогенних бактерій (Б1–Б26) з різних областей України були ідентифіковані нами як *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*. Вони мають подібні властивості з типовим штамом *P. carotovorum* J2 NCPPB 1744 [1]. Для вирощування бактерій використовували рідкі та агаризовані живильні середовища. Агаризовані живильні середовища містили 1,4% агару. Як джерело вуглецю використовували глюкозу і пектин. Мінімальне рідке середовище (М 9) містило:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 6 г/л,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3 г/л,  $\text{NaCl}$  – 0,5 г/л,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1 г/л. Після стерилізації на 1 л середовища додавали 1мл 1М розчину  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 100 мкл 10%  $\text{CaCl}_2$  і глюкозу в кінцевій концентрації



0,2% . Підрощування бактерій і індукцію бактеріоцинів проводили як описано в [5, 6]. Суміш бактеріоцинів розділяли центрифугуванням в центрифугі Beckman (США) при 30000 об./хв протягом 4-х годин в цукрозному градієнті (5–20%), з вмістом 10–20% етилового спирту. Осади макромолекулярних бактеріоцинів (MCTV) ресуспендували і діалізували в буфері М9 без глюкози.

Таблиця

## Штами бактерій, використані в дослідженні

Table

## Bacterial strains used in the research

Бактерії	Номер штама	Рослина-хазяїн	Місце виділення
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>Carotovorum</i> (Pcc)	NCPPB 1744 J2	<i>Daucus sativus</i> Roehl	Японія
	Б1	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Україна, Черкаська область
	Б3, Б4, Б13, Б15	- " -	Україна, Київська область, Новосілки
	Б2, Б11, Б12, Б16, Б17, Б23	- " -	Україна, Київська область, Васильків
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Pcc)	Pcc 62 A ATCC 15359	<i>Beta vulgaris</i> L.	Білорусь
	Pcc 2M	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Росія
	Pcc 153 ATCC 15359 (NCPPB 1847)	<i>Daucus sativus</i>	США, Шотландія

Бактеріофаг ZF40 виділяли методом злитного лізису [4]. Кілерну активність бактеріофага ZF40 і MCTV визначали за допомогою популяційних дисоціантів Pcc RC 5297 і Pcc RC 5195. Дисоціант Pcc RC 5195 не здатен до адсорбції бактеріофага ZF40, тоді як бактерії Pcc RC 5297 адсорбують як бактеріоцини типу фагових хвостових відростків, так і бактеріофаг ZF40 [2].

Для визначення морфології бактеріоцинів очищені препарати наносили на сіточки з нітроцелюлозними підтримувальними плівками і контрастували 2% ураніацетатом. Електронномікроскопічні дослідження проводили за допомогою мікроскопа JEOL 1400 (Японія) при інструментальному збільшенні 20000–40000.

До бактеріофагу ZF-40 і MCTV/ J2 одержували кролячу антисироватку. Концентрацію білка бактеріоцинів визначали за оптичною густиною розчину при 278нм на Spеcord. Згідно Shepard и Socor (Phytopatology, 1969) 12,3 оптичні одиниці відповідають 1мг/мл білка. До білкової суміші бактеріоцинів додавали рівний об'єм адьюванта Фрейнда і підшкірно імунізували кроля. Реімунізацію здійснювали через місяць. Білкову суміш вводили внутрішньовенно. Після реімунізації, через 7 днів, відбирали кров і одержували сироватку. Електрофоретичне розділення білків проводили за Laemmli [11]. Як маркери використовували стандартну суміш білків фірми Pharmacia (Швеція). Серологічну спорідненість білків бактеріофага ZF-40 і MCTV визначали за



Ouchterlony O. [15]. Імуноблотинг білків – по методу Towbin [16]. Перенос білкових смуг з ПААГ здійснювали на нітроцелюлозний фільтр Schleicher & Schul з розміром пор 0,45 мкм. Вільні місця на нітроцелюлозі блокували 1% розчином БСА в 20мМ трис-НСІ буфері, 20мМ трис-НСІ, з вмістом 0,5 М NaCl. Далі фільтри занурювали в розведену вищезазначеним буфером сироватку, одержану до бактеріофага ZF-40. Фільтри витримували з сироваткою протягом 10 год при кімнатній температурі й помірному помішуванні. Далі їх добре відмивали від сироватки й переносили в кон'югат „других” антитіл проти імуноглобулінів кроля, міченого фосфатазою „Sigma” NoA2556. Через 2 години фільтри добре промивали і переміщували їх у розчин бензидину в 20мМ трис-НСІ буфері з вмістом 0,14 М NaCl і 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Після потемніння смуг, імунохімічну реакцію зупиняли. Для цього фільтри переносили у дистильовану воду, добре промивали і висушували.

### Результати досліджень

У складі природних штамів *P. carotovorum*, виділених в різних областях України виявлені бактеріоцини у вигляді хвостових відростків (МСТV), довжиною від 550 до 780нм (а); МСТV у вигляді хвостових відростків зі скороченими чохлами довжиною 120–170 нм (б), дрібні сферичні бактеріоцини, діаметром 15–20 нм, а також сферичні частки, які нагадують фагові головки різного діаметру (50–120 нм) (с, д) (Рис. 1).

На рис. 2 видно зони лізису, спричинених МСТV, виділених з різних ізолятів бактерій щодо чутливої культури *P. carotovorum* RC 5297.

Ізоляти штамів *P. carotovorum* містять бактеріоцини, які лізують клітини бактерій-індикаторів по різному. МСТV не можуть адсорбуватися на клітинах, з яких вони були виділені. Також є відмінність між чутливістю бактерій, виділених з різних регіонів України до бактеріоцинів одне одного. Це може свідчити про те, що ізоляти бактерій відрізняються за набором МСТV, або на поверхні їх клітин відсутні відповідні рецептори.

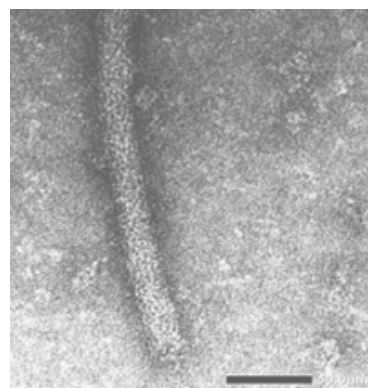
Бактеріоцини ізолятів Б1-Б26 електрофоретично розділяються на 12-15 білкових смуг [1]. Трьох мажорних білків з молекулярними масами 65 кД, 55 кД, 40 кД; 5 смуг проміжних білків з мол.масами 72 кД, 38 кД, 30 кД, 22 кД і 18 кД, а також 5 мінорних полосок : 86 кД, 76кД, 47кД, 46 кД и 45 кД. Згідно з даними літератури, МСТV штаму J2 мають білок 50 кД, якому відповідає покровний білок чохла скоротливого хвостового відростка; 19 кД – внутрішній білок стержня; 68 кД и 76кД – білки хвоста; 28кД, 36 кД і 42 кД – білки базальної пластинки і фібрил [8,14].

МСТV ізолятів бактерій Б1-Б26 дещо відрізняються за набором проміжних і мінорних фракцій білків від колекційного штаму J2. Наші результати відносно вмісту мажорних білків бактеріоцинів штаму J2 достатньо близько співпадають з даними японських дослідників [14]. Можливо, що в штамів різного походження може відбуватися перерозподіл проміжних і мінорних фракцій білків МСТV в залежності від складу множини бактеріоцинів. У складі бактеріофага ZF40 визначені 13 структурних білків з молекулярними масами від 16 до 90 кД [4] 4 з них – мажорні, 3 – проміжні, решта – мінорні фракції. Попередньо нами [3] за допомогою антисироватки, одержаної до бак-



теріоцинів типу фагових хвостових відростків, виділених з *Psc* J2 (Японія), виявлені серологічно споріднені але неідентичні білки в каротоворицинах *Psc* 2М (Росія), *Psc* 62А (Білорусь) та *Psc* 153 (США), а також було показано серологічну спорідненість білків бактеріоцинів з білками бактеріофага ZF-40.

В даній роботі за допомогою антисироватки, одержаної до бактеріофага ZF-40 у складі МСТV штамів Б1, Б2, Б16, Б23 виявлені серологічно споріднені та ідентичні білки з білками бактеріофага ZF-40 (Рис. 3а), а у складі МСТV з ізолятів *P. carotovorum* Б3, Б4, Б12, Б13, Б15 виявлені серологічно споріднені, але неідентичні білкові компоненти з білками бактеріофага ZF-40. Про це свідчить наявність «шпори» між смугами преципітації антигенів з антитілами (рис. 3б). (По центру рис. 3 а і б нанесена сироватка до бактеріофага ZF-40).



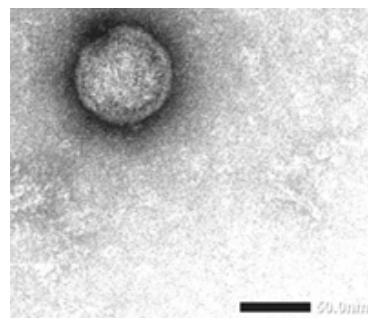
а) нескорочений хвостовий відросток ізоляту Б1

a) non-contractile tail-like particle of isolate B1



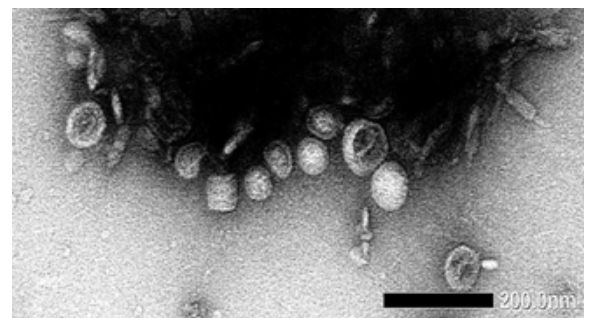
б) скорочені хвостові відростки виділені з ізоляту Б4

b) contractile tail-like particle, obtained from isolate B4



с) сферична частка з ізоляту Б2

c) spherical particle of isolate B2



д) суміш бактеріоцинів з ізоляту Б16

d) composition of bacteriocins from isolate B16

**Рис. 1. Електронномікроскопічне дослідження МСТV з ізолятів *P. carotovorum*, виділених в різних областях України**

**Fig. 1. Transmission electron microscopy of MCTV's *P. carotovorum* isolated from different regions of Ukraine**





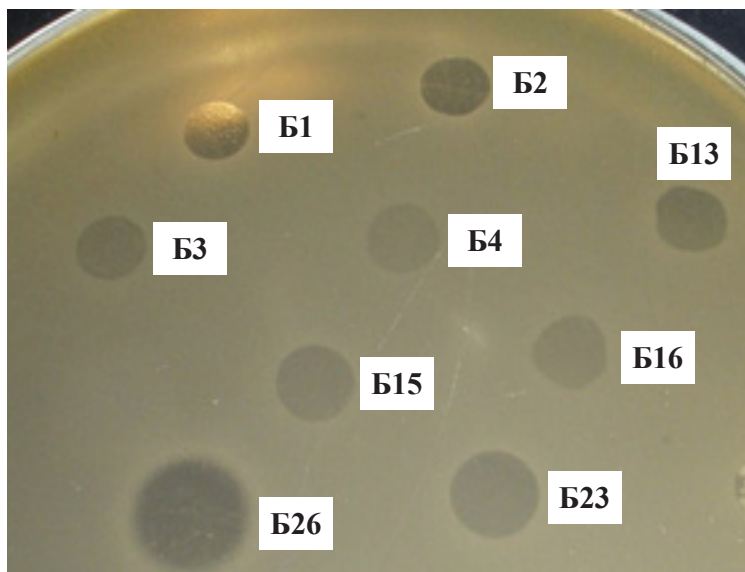


Рис. 2. Кілерна активність МСТВ, виділених з ізолятів *P. carotovorum* різних областей України відносно штаму *Pcc RC 5297*

Fig. 2. The killer activity against to strain *Pcc RC 5297* of MCTV *P. carotovorum* strains isolated from different regions of Ukraine

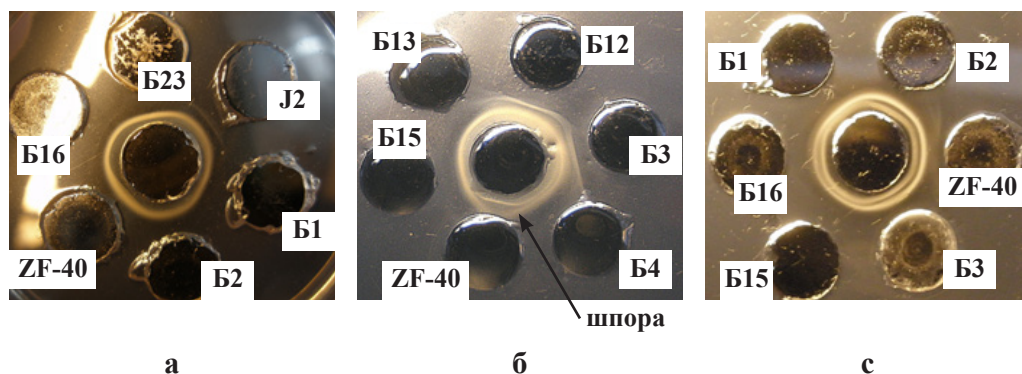


Рис. 3. Реакція імунопреципітації в 1% агарозному гелі

Примітка:

- а) серологічно споріднені та ідентичні білки з білками бактеріофага ZF-40 ;
- б) «шпора» між смугами преципітації антигенів з антитілами ;
- с) серологічно споріднені і ідентичні білкові компоненти .

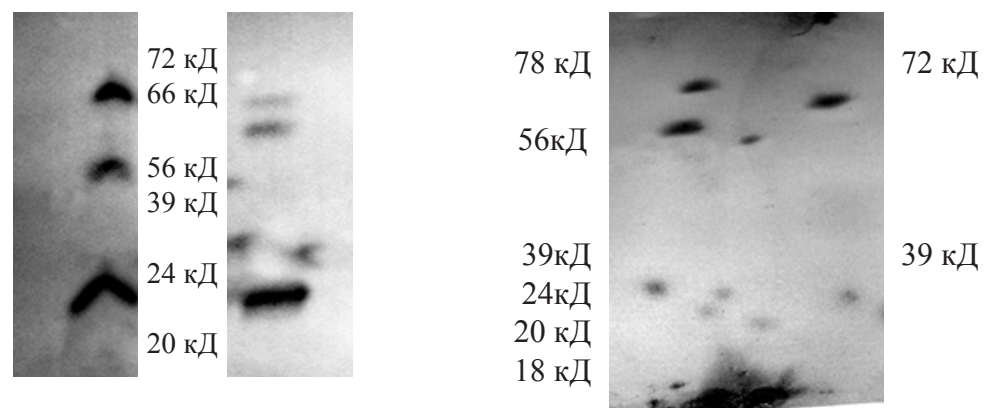
Fig. 3. The reaction of immunoprecipitation in 1% agarose gel

Note :

- a) serologically identity and identical proteins with proteins of ZF-40 bacteriophage
- b) "Spur" between the bands of antigen precipitation with antibodies
- c) serologically identity and identical proteins components

За допомогою антисироватки, одержаної до МСТV, виділених з колекційного штаму *P. carotovorum* J2 у складі бактеріоцинів, одержаних з «українських» ізолятів, а також у складі бактеріофага ZF-40 методом подвійної імунодифузії в агарозному гелі виявлені серологічно споріднені і ідентичні білкові компоненти (Рис. 3с).

При використанні антисироватки, одержаної до структурних білків бактеріофага ZF40 методом імуноблотинга виявлені серологічно споріднені білки у складі суміші МСТV і бактеріофага ZF40 з молекулярними масами 72, 66, 39 і 24кД (Рис. 4 а).



а) антисироватка до бактеріофага ZF40

б) антисироватка до МСТV/J2

**Рис. 4. Серологічно споріднені білки бактеріоцинів типу фагових хвостових відростків *P. carotovorum* і бактеріофага ZF 40, визначених методом імуноблоту:**  
а) – з використанням сироватки, одержаної до білкових компонентів бактеріофага ZF40;  
б) – з використанням сироватки, одержаної до МСТV/J2;

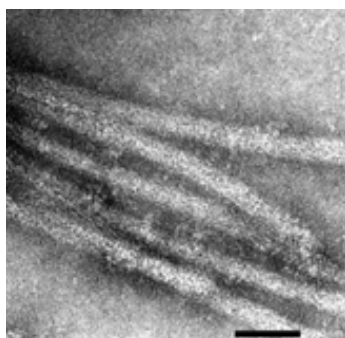
**Fig. 4. Serologically related proteins MCTV and bacteriophage ZF40 detected by immunoblotting method:**

а) –using the serum obtained for the protein components of the bacteriophage ZF40;  
б) – using serum obtained from MCTV/J2;

Методом імуноблотингу з використанням антисироватки, одержаної до МСТV/J2, виявлені серологічно споріднені білки з молекулярними масами 78, 56, 39, 20 і 18 кД у бактеріоцинів та 72 і 39 кД у бактеріофага ZF-40 (Рис. 4б)

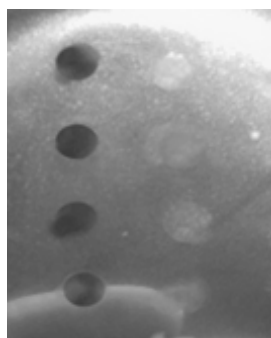
Відомо, що у бактеріофага ZF40, а також у МСТV основні структурні білки хвостових відростків мають відповідно значення молекулярних мас: білок футляра – 71, 40, 31, 50 кД, внутрішній білок стрижня – 19–20 кД і білки фібрил – 56, 72, 76, 78 кД у бактеріофагів [4] і 68, 72, 78 кД у бактеріоцинів [8]. Скоріш за все, білки фібрил визначають специфічність адсорбції каротоворицинів [8, 14]. Загальними, виявленими нами, методом імуноблоту білками фібрил для досліджуваних часток МСТV і ZF40 являються білки з молекулярними масами близько 66 і 72 кД.

Обробка зразків МСТV антисироваткою, одержаною до бактеріофагу ZF40, призводить до агрегації часток бактеріоцинів (Рис. 5а).



Агрегат хвостових відростків *PccJ2*

**а**



1 II  
*Pcc RC5297*

**б**

**Рис. 5. а) – Агрегат МСТV; б) – Кілерна активність бактеріоцинів до обробки їх антисироваткою (I) і після обробки антисироваткою одержаною до бактеріофага ZF-40 (II) відносно *P. carotovorum* RC5297**

**Fig. 5. a) – Aggregates of MCTV ; b) – The killer activity of MCTV before (1) and after (II) treatment with antiserum obtained for bacteriophage ZF40 regarding *P. carotovorum* RC5297**

Причину утворення агрегату ми поки що достовірно пояснити не можемо. Можливо, наявні в МСТV білкові компоненти, споріднені таким у складі бактеріофага ZF40, зв'язуються з антитілами, одержаними до білків бактеріофага. Можлива наявність і інших причин появи таких агрегатів. Ця агрегація часток призводить до втрати кілерних властивостей МСТV. Бактеріоцини, виділені з бактерій *Pcc153*(США), *Pcc 2M* (Росія), *Pcc 62 A* (Білорусь) втрачали кілерну активність відносно чутливого штаму *Pcc RC5297* після обробки їх антисироваткою до ZF40 (Рис. 5 б)).

Лізувальна активність бактеріофага ZF40, обробленого антисироваткою, одержаною до МСТV/J2, також суттєво знижувалася [3].

Таким чином, в результаті проведених досліджень, у складі МСТV, виділених з *Pectobacterium carotovorum* різних областей і бактеріофага ZF40 за допомогою антисироваток, одержаних до МСТV/J2, і до бактеріофага ZF40, знайдені серологічно споріднені білкові компоненти. За молекулярною масою (66 кД і 72 кД) вони належать до складу фібрил. Ці компоненти можуть бути факторами впізнавання спільних рецепторів на бактеріальній клітині.

Попередньо ми досліджували виживання клітин *Pcc RC 5297* при змішаній інфекції [2]. Критерієм слугували бактеріальні клітини, що вижили після інкубації з фагом, бактеріоцином, а також суміші ZF40 і МСТV/J2 відповідно. При цьому спостерігали збільшення летальної дози при адсорбції суміші фага і каротоворицина в 4 рази порівняно з адсорбцією тільки фагом і в 2 рази порівняно з МСТV/J2. Можливо, такі низькі показники кількості клітин індикаторного штаму, що вижили при сумісному зараженні фагом і бактеріоцином також вказують на спільні рецептори на клітинній оболонці бактерії.

Для доведення наявності конкуренції за рецептори при сумісному зараженні, проведено підрахунок кількості неадсорбованого фага при адсорбції його на нативних клітинах бактерій. В результаті проведених експериментів було показано факт сумісності рецепторів штаму *Psc Rc 5297* для бактеріофага ZF40 і MCTV/J2 [2].

В результаті досліджень виявилось, що у випадку сумісного зараження клітин фагом ZF40 і бактеріоцином J2, кількість неадсорбованого фага в 2 рази перевищує кількість фагових часток при моноінфекції. Таким чином, адсорбційна здатність фага ZF40 і MCTV/ J2 корелює з наявністю серологічно споріднених білків у складі їх часток.

Отже, результати представлених досліджень показують, що ізоляти *P. carotovorum* з різних регіонів України під дією налідиксової кислоти виділяють велику множину дефектних часток, які, імовірно, представляють собою продукти збірки дефектних помірних фагів при SOS-індукції лізогенних клітин *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*. Б1, Б3, Б4, Б11, Б12, Б13, Б15, Б16, Б17, Б23, Б26 крім хвостових відростків різної довжини, продукують і сферичні частки, що нагадують фагові головки різного діаметру. При цьому фагоподібні частки відрізняються не тільки за лінійними розмірами, але й за морфолого-структурною організацією.

Виявлені серологічно споріднені білки у складі MCTV ізолятів природних штамів *P. carotovorum* та бактеріофага ZF-40 свідчать про фагову природу виділених кілерних часток. Крім того серологічно споріднені компоненти у складі MCTV і бактеріофага ZF40 можуть бути факторами впізнання спільних рецепторів бактеріальною клітиною, бо існує конкуренція при адсорбції на індикаторному штамі *Psc Rc 5297* в умовах змішаної інфекції фага ZF40 і MCTV/ J2.

#### Л.А. Максименко

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,  
тел.:+38(044)526 94 24, e-mail: maksymenko.l.a@gmail.com

### МОРФОЛОГО-СТРУКТУРНЫЕ, КИЛЛЕРНЫЕ И СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БАКТЕРИОЦИНОВ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM SUBSP. CAROTOVORUM* И ИХ РОДСТВО С БАКТЕРИОФАГОМ ZF 40

#### Реферат

**Цель.** Определение родства между белковыми компонентами макромолекулярных бактериоцинов (MCTV), выделенных из разных природных изолятов *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* и бактериофага ZF 40.  
**Методы.** Бактериоцины *P. carotovorum* получали индукцией налиндиксовой кислотой. Смесь каротоворицинов разделяли ультрацентрифугированием. Электронномикроскопические исследования бактериоцинов проводили



при помощи микроскопа JEOL 1400. Бактериофаг ZF 40 выделяли методом слитного лизиса. Киллерную активность MCTV и бактериофага ZF 40 изучали с помощью популяционных диссоциантов бактерий RC 5297 и RC 5195. Серологическое родство белковых компонентов MCTV и бактериофага ZF 40 определяли с помощью полученных к указанным структурам соответствующих кроличьих антисывороток. **Результаты.** Фитопатогенные бактерии *P. carotovorum* в результате индукции налидиксовой кислотой, продуцируют множество макромолекулярных бактериоцинов. Они проявляют антимикробное действие относительно разных штаммов бактерий *P. carotovorum* и *Escherichia coli*. Электронномикроскопические исследования очищенных фракций MCTV изолятов *P. carotovorum* из разных областей Украины (Б1-Б26) показали, что они имеют вид хвостовых отростков бактериофагов, а также сферических частиц разного диаметра. Белковый состав MCTV разных изолятов *P. carotovorum* могут отличаться минорными фракциями пептидов. С помощью кроличьей антисыворотки, полученной к MCTV J2, выявлены серологически родственные белки в составе бактериофага ZF 40. Методом иммуноблотинга с использованием антисыворотки, полученной к структурным белкам бактериофага ZF 40, выявлены серологически родственные белки в составе MCTV J2 и бактериофага ZF 40 с молекулярными массами 72, 66, 39 и 24 кДа. Обработка смеси MCTV кроличьей антисывороткой к бактериофагу ZF 40, приводит к утрате их киллерной активности. **Выводы.** MCTV, полученные из лизатов новых изолятов бактерий *P. carotovorum*, выделенных в Украине представляют собой большое множество, отличаются по размерам и имеют разные морфолого-структурные показатели. Они имеют в своем составе серологически родственные белки с белковыми компонентами бактериофага ZF40. Полученные факты свидетельствуют о фаговой природе макромолекулярных бактериоцинов.

*Ключевые слова:* *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, макромолекулярные бактериоцины, бактериофаг ZF 40, белки, серологическое родство

**L.O. Maksymenko**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,  
154, Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine,  
tel.: +38(044)526 94 24; e-mail: maksymenko.l.a@gmail.com

**MORPHO-STRUCTURAL, KILLER  
AND SEROLOGICAL PROPERTIES OF  
MACROMOLECULAR BACTERIOCINS OF  
PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM SUBSP.  
CAROTOVORUM AND THEIR RELATEDNESS TO  
BACTERIOPHAGE ZF40**

**Summary**

*The aim* was to examine the relationship between the protein components of macromolecular bacteriocins (MCTV) obtained from different natural isolates of *Pectobacterium carotovorum* and bacteriophage ZF40. *Methods.* Bacteriocin production was obtained by nalidixic acid. The bacteriocin samples were separated



by ultracentrifugation. Transmission electron microscopy of bacteriocins was performed using JEOL 1400. Phage ZF40 was obtained by confluent lysis. MCTV and phage killer activity were tested against RC5297 and RC5195 population dissociants. The serological relatedness of MCTV and phage ZF40 was examined using specific rabbit antisera. **Results.** The phytopathogenic bacteria *P. carotovorum* produce a variety of macromolecular bacteriocins under nalidixic acid induction. They show antimicrobial activity against different strains of *P. carotovorum* and *Escherichia coli*. Electron microscopy analysis of purified MCTV fractions of the *P. carotovorum* strains isolated in different part of Ukraine has shown that they have the appearance of bacteriophage tails and spherical particles of different diameters. The protein composition of MCTV from the various *P. carotovorum* isolates differ by minor peptide fractions. Using rabbit antiserum, serologically related proteins were detected in phage ZF40 and MCTV J2. Immunoblotting analysis with rabbit antiserum against the ZF40 structural proteins has revealed serologically related proteins of 72.66, 39 and 24 kDa in the structure of MCTV J2 and phage ZF40. Applying by rabbit antiserum against phage ZF40 resulted in the loss of MCTV killer activity. **Conclusions.** MCTVs obtained from lysates of new isolates of *P. carotovorum*, isolated in Ukraine, differ in size and have different morphological and structural parameters. They consist of proteins serologically related to the ZF40 structural proteins. Obtained data confirmed bacteriophage nature of macromolecular bacteriocins.

*Key words:* *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, macromolecular bacteriocins, bacteriophage ZF40, proteins, serological relationships.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Максименко Л.А., Пархоменко Н.И., Мороз С.Н., Горб Т.Е. Изучение свойств изолятов пектолитических фитопатогенных бактерий, выделенных в Украине // Микроб. журн. – 2013. – 75. №6. – С. 66–72.
2. Максименко Л.А., Романюк Л.В. Связь серологического родства белков с адсорбцией частиц бактериоцина *Pectobacterium carotovorum* J2 и бактериофага ZF-40. // Доповіди НАН України. 2016. №12. – С. 90–94.
3. Максименко Л.А., Товкач Ф.И. Серологическое родство бактериоцинов *Erwinia carotovora*, выделенных из различных экологических ниш, со структурными белками бактериофага ZF-40. // Доповіди НАНУ. 2012. 7: 158–163.
4. Паницина А.И., Товкач Ф.И., Романюк Л.В., Максименко Л.А. Физико-химические свойства умеренного бактериофага ZF-40 *Erwinia carotovora* // Микроб. журн., 2007. – Т. 69, № 2. – С. 15–22.
5. Товкач Ф.И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 1998. – 67, № 6. – С. 767–774.
6. Товкач Ф.И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – 71, № 3. – 359–367.
7. Товкач Ф.И. Структурная организация частиц и рестрикционный анализ ДНК умеренного бактериофага ZF-40 *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – 71, № 1. – С. 75–81.
8. Товкач Ф.И., Максименко Л.А. Полипептидный состав и киллерная специфичность как показатели множественности каротоворицинов // Микробиол. журн. – 2010. – 72. № 5. – С. 41–48.



9. Comeau A. M., Tremblay D., Moineau S., Rattei T., Kushkina A.I., Tovkach F.I., Krisch H.M., Ackermann H.W. Phage morphology recapitulates phylogeny: The comparative genomics of a new group of myoviruses// PLoS ONE. – July 2012. – 7. –N 7. – 40102.
10. Daw M.A. Bacteriocins: nature, function and structure//M.A.Daw, F.R.Falkiner// Micron. – 1996. – V. 27, № 6. – P. 461–479.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T // Nature. – 1970. – 227. № 5259. –P. 680–685.
12. Maeda A., Nomura M. Interaction of colicins with bacterial cells. I. Studies with radioactive colicins// J. Bacteriol. – 1966. – 91, № 2. – P. 685–694.
13. Nakayama K., Takashima K., Ishihara H. et al. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage //Mol.Microbiol. – 2000. – 38, N 2. – P. 213–231.
14. Nguyen H.A., Tomita T.T., Hirota M., Sato T., Kamio Y. A simple purification method and morphology and component analyses for carotovoricin Er, a phage- *Erwinia carotovora* Er// Bioshi.Biotechnol.Biochem. 1999. – 63,N8. – P. 1360–1369.
15. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. In Hadbook immunodiffusion and Immunodiffusion and Immuno electrophoresis// Ann. Arbor.Michigan.Ann.Arbor.Science Publishers. – 1968. – P. 37.
16. Towbin H., Stalhelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. – 1979. – 76.N9. – P. 4350–4354.

## References

1. Maksymenko LA, Parkhomenko N I, Moroz SN, Gorb TE. Properties Investigation of isolates of pectolitic phytopathogenic bacteria obtained in Ukraine. Microbiol.j.2013;75(6):66-72. (In Russian)
2. Maksymenko LA, Romaniuk LV. The relation between the serological similarity of proteins and the adsorption of particles of *Pectobacterium carotovorum* J2 bacteriocins and bacteriophage ZF40. Dopov. NANU.2016; 12: 90-95 (In Russian).
3. Maksymenko LA, Tovkach FI. Serological relationship of bacteriocins' proteins of *Erwinia carotovora* isolated from various ecological regions and with structural proteins of bacteriophage ZF40. Dopov.NANU. 2012;7:158-163. (In Russian)
4. Panshchina AI, Tovkach FI, Romaniuk LV, Maksymenko LA. Physico-chemical properties of temperate bacteriophage ZF40 of *Erwinia carotovora* .Microbiol. J.2007;69(2):15-22. (In Russian)
5. Tovkach FI. Biological properties and classification of *Erwinia carotovora* bacteriocins. Microbiology.1988; 67(6): 767-774. (In Russian)
6. Tovkach FI. Defective lisogeny in *Erwinia carotovora*. Microbiology. 2002; 71(3): 359-367. (In Russian)
7. Tovkach FI. Temperate bacteriophage ZF40 of *Erwinia carotovora*: Phage particle structure and DNA restriction analysis. Microbiology. 2002; 71(1): 75-81. (In Russian)



8. Tovkach FI, Maksymenko LA. Polypeptide composition and killer specificity as indices of multiplicity of carotovoricins. *Microbiol.J.* 2010; 72(5) :41-48 (In Russian).
9. Comeau AM, Tremblay D, Moineau S, Rattei T, Kushkina AI, Tovkach FI, Krisch HM, Ackermann HW. Phage morphology recapitulates phylogeny: The comparative genomics of a new group of myoviruses. *PLoS ONE.* 2012; 7(7): 40102.
10. Daw MA. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron.* 1996; 27(6): 461-479.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T . *Nature.* 1970; **227**(5259): 680-685.
12. Maeda A, Nomura M. Interaction of colicins with bacterial cells. I. Studies with radioactive colicins. *J. Bacteriol.* 1966; **91**, №2 :685-694.
13. Nakayama K, Takashima K, Ishihara H. et al. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage . *Mol.Microbiol.* 2000; 38, №2 :213-231.
14. Nguyen HA, Tomita TT, Hirota M, Sato T, Kamio Y. A simple purification method and morphology and component analyses for carotovoricin Er, a phage-*Erwinia carotovora* Er. *Bioshi.Biotechnol.Biochem.* 1999; 63, N8:1360-1369.
15. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels . In *Handbook immunodiffusion and Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis.* Ann.Arbor. Michigan. Ann.Arbor. Science Publishers. 1968 :37.
16. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA.* 1979; 76(9):4350-4354.

Стаття надійшла до редакції 28.05.2020 р.





**Н.Ю. Васильєва, І.В. Страшнова, О.В. Басюл, І.О. Ковтун,  
В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,  
e-mail: [tatkamic@onu.edu.ua](mailto:tatkamic@onu.edu.ua)

## **СТІЙКІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ КОКІВ, ІЗОЛЬОВАНИХ З ЧОРНОМОРСЬКИХ ВОДОРОСТЕЙ І МІДІЙ**

*Метою роботи є визначення стійкості до антибіотиків молочнокислих коків, виділених з чорноморських водоростей і мідій *Mytilus galloprovincialis*. Методи.* Класичні мікробіологічні методи використовували для вивчення культуральних і фізіолого-біохімічних характеристик. Визначення бактерій до виду здійснювали за спектром жирних кислот з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock методом газової хроматографії. На підставі отриманих результатів ізоляти віднесені до видів *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus bovis* і *Leuconostoc mesenteroides*. Стійкість до антибіотиків визначали диско-дифузійним методом. Графічну обробку даних проводили за програмою Microsoft Excel та R 3.4.0. **Результати.** Ізольовані бактерії за сукупними фізіолого-біохімічними ознаками та за складом жирних кислот віднесені до родів *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*. Показано, що більшість бактерій роду *Enterococcus* стійкі до бензилпеніциліну (85,7%) і цефазоліну (71,4%). Майже половина з них стійкі також до рифампіцину, цефіксиму і стрептоміцину (42,9%). Представники роду *Pediococcus* резистентні до бензилпеніциліну (83,3%), цефазоліну (83,3%), канаміцину (66,7%) і цефіксиму (66,7). Бактерії роду *Streptococcus* були найбільш стійкими до дії антибіотиків. Процент стійких штамів коливався від 50,0% до 100,0% в залежності від антибіотика. Показники стійкості до антибіотиків представників роду *Leuconostoc* були досить варіативними та їх профіль відрізнявся від усіх інших молочнокислих коків. Представники роду *Lactococcus* були стійкими майже до усіх досліджених антибіотиків. **Висновки.** На основі отриманих даних встановлено, що більшість досліджених чорноморських штамів молочнокислих коків, асоційованих з водоростями і мідіями володіють природною резистентністю до антибіотиків.

*Ключові слова:* молочнокислі коки, Чорне море, водорості, *Mytilus galloprovincialis*, антибіотики, резистентність

Зрослий останнім часом інтерес до пробіотичних бактерій додав популярності технологіям, які використовують молочнокислі бактерії. Серед найбільш поширених представників молочнокислих бактерій, які використовують для виготовлення продуктів харчування, представники родів *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* і *Lactobacillus* [12].



Однак, на сьогодні, роль молочнокислих бактерій як резервуара детермінант стійкості до антибіотиків з потенціалом передачі їх до патогенних видів все більше визнається [16, 19].

Деякі види *Lactococcus*, які традиційно використовуються для приготування кисломолочних продуктів і відносяться до непатогенних бактерій, також ніколи не вважалися загрозою для людини [18]. Технологічні властивості представників *Lactococcus*, в основному, пояснюються їх здатністю до швидкого підкислення завдяки продукуванню L-молочної кислоти. Нажаль, і серед представників *Lactococcus*, ізольованих з продуктів харчування, все частіше ідентифікують стійкі до антибіотиків штами [18].

Наприклад, дослідженнями Flo'rez з колегами [11] показано присутність стійких до антибіотиків штамів *Lactococcus* у сирому молочному сирі, причому деякі з них мали плазмиду з множинною лікарською стійкістю pK214 і ген mdt(A), раніше позначений як mef214 (множинний транспортер ліків) [16], який надає стійкості штамам *Lactococcus* до макролідів, лінкозамідів, стрептограмінів і тетрацикліну.

Ще одними з досить популярних штамів молочнокислих бактерій, які використовують при виготовленні продуктів харчування є представники роду *Enterococcus*, чий внесок у органолептичні властивості ферментованих харчових продуктів та здатність виробляти бактеріоцини (ентероцини) є важливими характеристиками для їх застосування в харчовій технології. Дослідження мікробіоти традиційних сирів в країнах Середземномор'я, які в основному виробляються з овечого або козячого молока, показали, що ентерококи відіграють важливу роль у дозріванні цих сирів, ймовірно, завдяки здатності виробляти ліполітичні ферменти і розщепляти цитрати, що сприяє їх типовому смаку і аромату. Вони також присутні в інших ферментованих харчових продуктах, таких як ковбаси та маслини [6].

Така ситуація спостерігається і при використанні інших потенційних пробіотичних молочнокислих бактерій, ізольованих з продуктів харчування. У зв'язку з цим актуальним є пошук нового джерела мікроорганізмів-пробіотиків, наприклад тих, що мешкають у морі або існують серед мікробіоти, що асоційована з гідробіонтами.

Метою даного дослідження було визначення стійкості до антибіотиків молочнокислих коків, що ізольовані з чорноморських водоростей і мідій *Mytilus galloprovincialis*.

### Матеріали та методи

Молочнокислі бактерії ізолювали з чорноморських мідій *Mytilus galloprovincialis*, зібраних за допомогою легководолазного обладнання на глибині 5–6 м в Одеській затоці (Малий Фонтан) на відстані від берега 300–400 м к.б.н. Ковтуном О.О. з зелених та червоних водоростей Чорного моря родів *Ulva*, *Enteromorpha*, *Porphyra*, *Cladophora*, *Polysiphonia*. У результаті було ізолювано та досліджено 32 штами молочнокислих коків.

Зразки мідій транспортували в лабораторію в контейнерах об'ємом 10 л з морською водою впродовж до 3 год. Мідії тричі промивали морською водою, яку попередньо фільтрували та стерилізували шляхом автоклавування.



Після цього, зовнішню поверхню мушлі молюсків опромінювали в боксі ультрафіолетом протягом 15 хв, стерильним скальпелем розрізали мускул-замикач, розкривали мушлі, тканини молюсків вилучали та гомогенізували механічним шляхом. Серійні розведення готували з 1 см<sup>3</sup> отриманого гомогенату на стерильному фізіологічному розчині, висівали на щільне середовище MRS та культивували при температурі 37,0 °C протягом 48–72 год.

Штами молочнокислих коків, асоційованих з зеленими та червоними водоростями Чорного моря родів *Ulva*, *Enteromorpha*, *Porphyra*, *Cladophora*, *Polysiphonia*, отримали після висіву змивів з їх поверхонь на селективне живильне середовища MRS-агар [4].

Ідентифікацію до роду проводили на підставі основних морфологічних, культуральних і біохімічних тестів [4]. Видову ідентифікацію штамів проводили за складом жирних кислот клітинних ліпідів з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на газовому хроматографі Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA) з капілярною колонкою ULTRA-2 (25мм × 0,2 мм × 0,33мкм) і полум'яно-йонізаційним детектором [2] Для ідентифікації досліджуваних штамів використовували бібліотеку RSTBA6 6.2.

Для визначення рівня резистентності до антибіотиків отриманих ізолятів використовували диско-дифузійний метод. Досліджували антибіотики, які входять до груп макролідів, аміноглікозидів, цефалоспоринів, хінолонів, пеніцилінів, амфеніколів, тетрациклінів та рифампіцинів (концентрація антибіотика у дисках наведена у таблиці 1). За розміром зони пригнічення росту (мм) всі штами поділяли на чутливі, проміжні та стійкі до даного антибіотика, згідно з рекомендацією EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [9].

### Результати та їх обговорення

За результатами вивчення складу жирних кислот клітинних ліпідів вивчені штами молочнокислих коків були віднесені до представників *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus bovis*, *Leuconostoc mesenteroides* і *Lactococcus spp.*

У результаті проведених досліджень показано (рис. 1), що 14,3% досліджених штамів *Enterococcus* виявилися стійкими до макролідів (кларітроміцин і ерітроміцин). Слід відзначити, що цей показник значно перевищує рівень стійкості до антибіотиків цієї групи у представників *Lactobacillus*, який описано нами раніше [1].

До аміноглікозидів, які використовують в основному при лікуванні кишкових інфекцій стійкими до канаміцину виявилися 28,6% і до стрептоміцину 42,9% штамів *Enterococcus*.

Максимальна кількість бактерій (85,7%) була резистентною до бензилпеніциліну, а до ампіциліну і оксациліну стійкими виявилися 14,3% штамів (рис. 1).

Досліджені штами *Enterococcus*, виявилися стійкими по відношенню до цефазоліну (71,4%) і цефіксиму (42,9%). Частка стійких штамів до хлорам-

феніколу і тетрацикліну становила 14,3% (рис. 1), а до рифампіцину – 42,9%, що набагато більше, ніж у представників роду *Lactobacillus* [1].

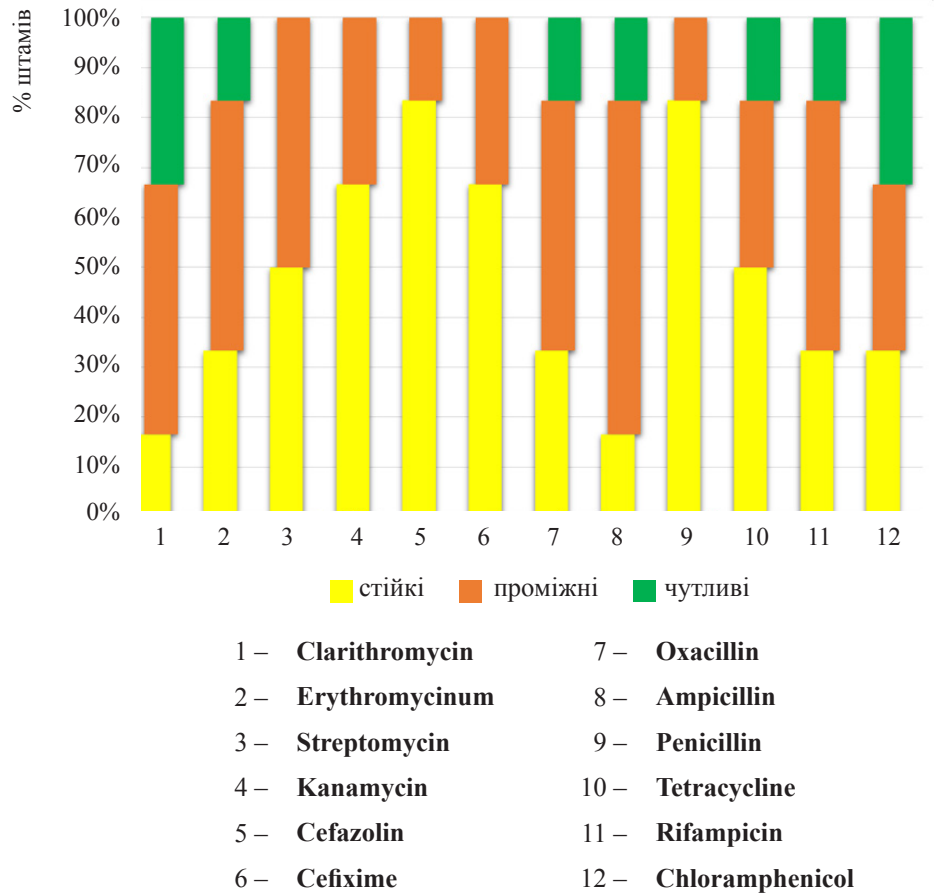


Рис. 1. Частка штамів *Enterococcus faecalis*, ізольованих з чорноморських водоростей і мідій, в залежності від рівня резистентності до антибіотиків

Fig. 1. Percentage distribution of *Enterococcus faecalis* strains isolated from Black Sea algae and mussels depending on antibiotic resistance level

З літературних джерел відомо, що представники *Enterococcus* володіють як природною, так і набутою стійкістю до антибіотиків [13]. Більшість ентерококків, ізольованих з молочних і м'ясних продуктів харчування, чутливі до ампіциліну (100%), левофлоксацину (від 80 до 95%) і хлорамфеніколу (90–100%) та мають високу частку штамів з проміжною резистентністю до цедоспоринів (80–90%) [10]. Серед цих представників молочнокислих коків також поширеною є резистентність до тетрацикліну, макролідів, аміноглікозидів, хінолонів, а також до глікопептидів (ванкоміцин) [13].

Аналіз бактерій, які були ідентифіковані як *Pediococcus pentosaceus*, свідчить про те, що вони характеризувалися досить високим рівнем резистентності до аміноглікозидів. Частка стійких штамів до стрептоміцину становила 50,0%, а до канаміцину – 66,7% (рис. 2).



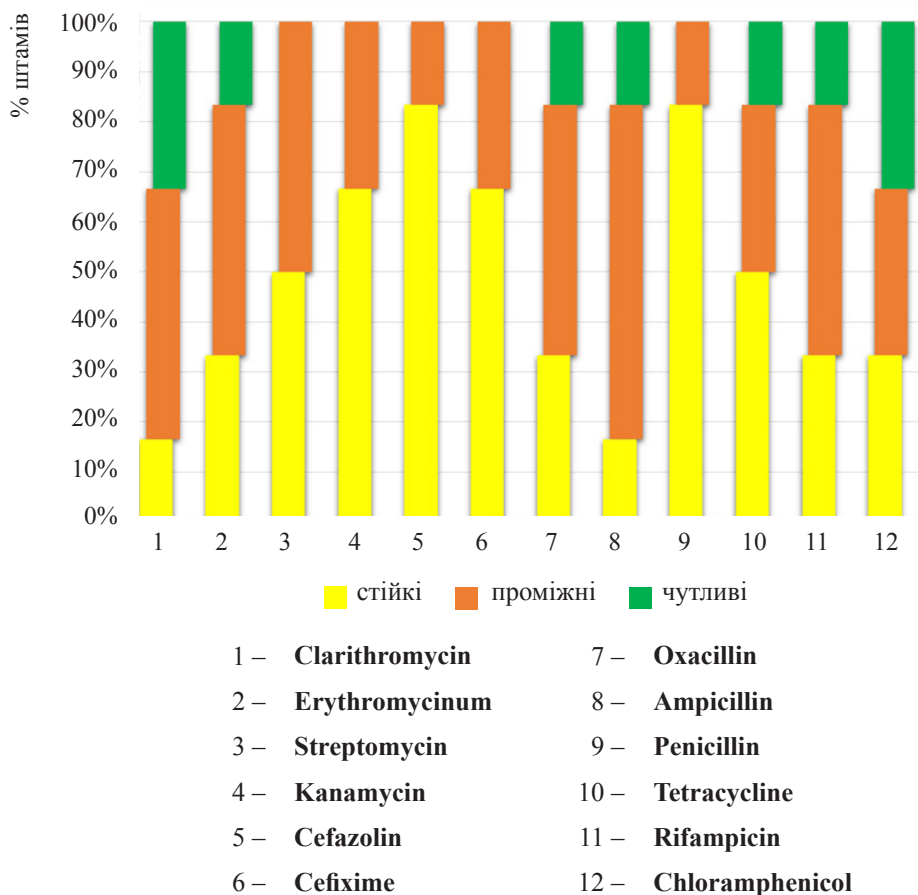


Рис. 2. Частка штамів *Pediococcus pentosaceus*, ізольованих з чорноморських водоростей і мідій, в залежності від рівня резистентності до антибіотиків

Fig. 2. Percentage distribution of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Black Sea algae and mussels depending on antibiotic resistance level

Процент штамів роду *Pediococcus*, стійких до цефазоліну склав 83,3%, до цефіксиму – 66,7%, а до антибіотиків групи пеніцилінів на представників *Pediococcus pentosaceus* майже не впливав бензилпеніцилін (83,3% стійких штамів).

Стійкість до макролідів представників *Pediococcus* була низькою – від 16,7 до 33,3% штамів. З літературних джерел відомо, що штами *Pediococcus* чутливі до макролідів [14]. Однак отримані нами дані свідчать, що для штамів *Pediococcus*, ізольованих з чорноморських водоростей і мідій більш характерною була проміжна резистентність до макролідів (рис. 2).

На відміну від представників *Pediococcus pentosaceus* штами, ідентифіковані як *Streptococcus bovis*, мали високу стійкість до макролідів. Як наочно видно з рис. 3, кількість стійких штамів до кларитроміцину і еритроміцину становила 50,0% від усіх досліджених штамів *Streptococcus*.

Стійкість до макролідів у представників *Streptococcus* зазвичай опосередковано забезпечується двома основними механізмами. По-перше, модифі-

кацією сайта-мішені рибосомальної метилази, який пов'язаний з генами erm (ermA і ermB). По-друге, макролід-специфічним механізмом відтоку (фенотип M), який кодується генами mef [15]. Механізми стійкості до тетрацикліну у *Streptococcus* включають білки рибосомального захисту, які, в основному, кодується генами tetM/ tetO або tetK/ tetL [8].

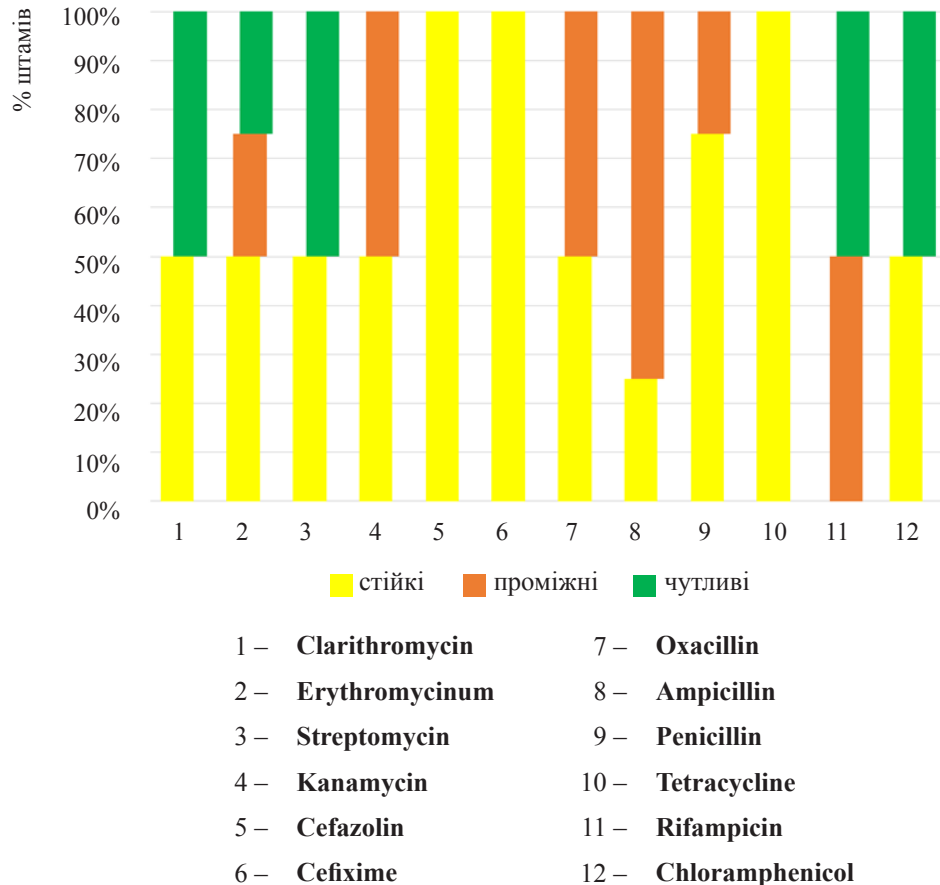


Рис. 3. Частка штамів *Streptococcus bovis*, ізольованих з чорноморських водоростей та мідій, в залежності від рівня резистентності до антибіотиків

Fig. 3. Percentage distribution of *Streptococcus bovis* strains isolated from Black Sea algae and mussels depending on antibiotic resistance level

Часто представники роду *Streptococcus* стають причиною неонатального сепсису і менінгіту, а також виявляються як патогени у вагітних жінок і літніх людей [17]. Тому, можливо, високий рівень резистентності до антибіотиків пов'язаний саме з широкою практикою використання антибіотикотерапії при лікуванні захворювань, викликаних представниками *Streptococcus*. При цьому рівень резистентності до еритроміцину, який спостерігається в нашому дослідженні (50,0%), вказує на необхідність ретельного епідагляду.

Аналіз стійкості до антибіотиків штамів *Leuconostoc mesenteroides-dextranicum* показав значні відмінності від усіх молочнокислих коків, які ми досліджували раніше.



Відомо, що штами *Leuconostoc mesenteroides-dextranicum* [10] в основному відповідальні за ферментацію різних овочів, таких як кімчи (корейська ферментована рослинна їжа) і квашеної капусти [10], в умовах низької температури і помірної солоності, хоча деякі з представників *Leuconostoc* були виділені з молочних продуктів, таких як сир.

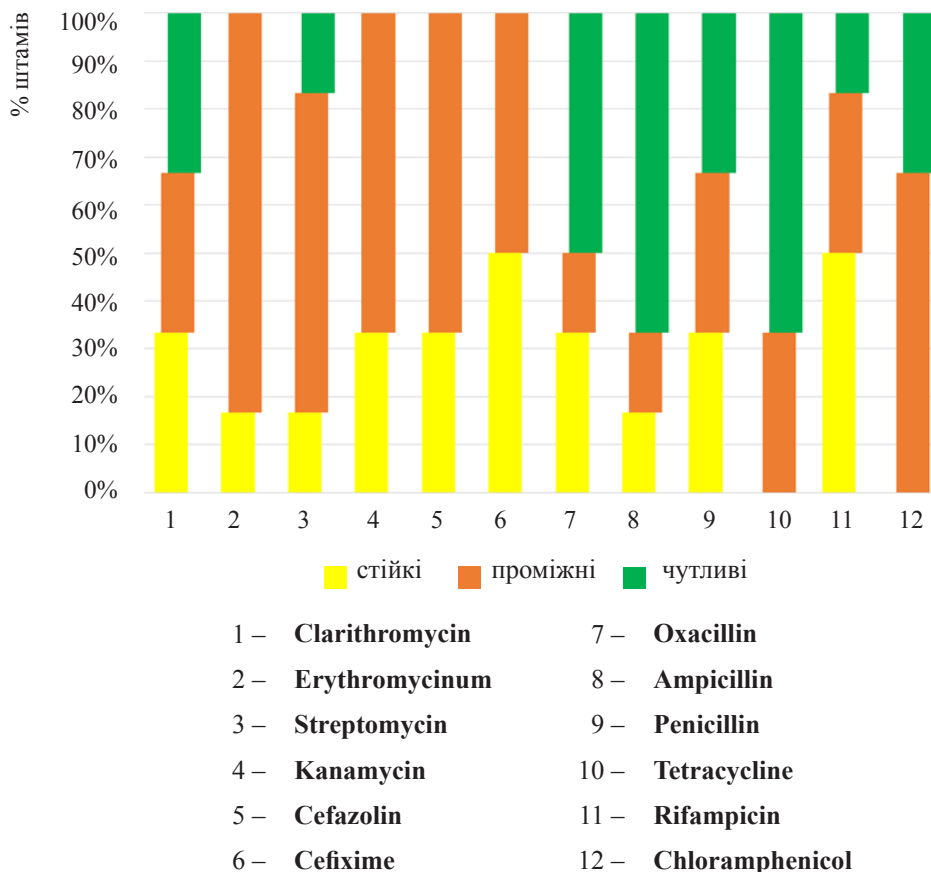


Рис. 4. Розподіл штамів *Leuconostoc mesenteroides*, ізольованих з чорноморських водоростей та мідій, в залежності від рівня резистентності до антибіотиків

Fig. 4. Percentage distribution of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from Black Sea algae and mussels depending on antibiotic resistance level

Показано, що серед досліджених бактерій *Leuconostoc mesenteroides*, кількість стійких до макролідів штамів склала до клатитроміцину 33,3%, а до еритроміцину – 16,7%, що співпадає з даними літератури [14].

Аналіз результатів вивчення стійкості бактерій *Leuconostoc mesenteroides* по відношенню до аміноглікозидів показав, що кількість штамів стійких до канаміцину склала 33,3%, а по відношенню до стрептоміцину – 16,7% (рис. 4). При цьому чутливі штами були практично відсутні.

Штами резистентні до хлорамфеніколу і тетрацикліну серед *Leuconostoc mesenteroides* не були виявлені. При цьому, кількість штамів, стійких до ри-

фампіцину становила 50,0% (рис. 4). Можливо це пов'язано з тим, що представники *Leuconostoc* досить часто є супутніми при захворюваннях, що лікують з використанням рифампіцину [5].

Ізольовані представники роду *Lactococcus sp.* володіють високим рівнем стійкості до антибіотиків. За даними літератури [26] бактерії роду *Lactococcus* вважаються стійкими до тетрацикліну, стрептоміцину, кліндамицину і еритроміцину [18].

Досліджені штами *Lactococcus sp.* виявилися чутливими до тетрацикліну та рифампіцину (100,0%). До еритроміцину і кларитроміцину і досліджені штами проявили проміжний рівень стійкості (до 80,0% від усіх досліджених штамів) (рис. 5).

По відношенню до аміноглікозидів штами *Lactococcus sp.* були стійкими (рис. 5) – 100,0% стійких штамів до стрептоміцину та канаміцину.

При аналізі даних за рівнем стійкості до антибіотиків у молочнокислих

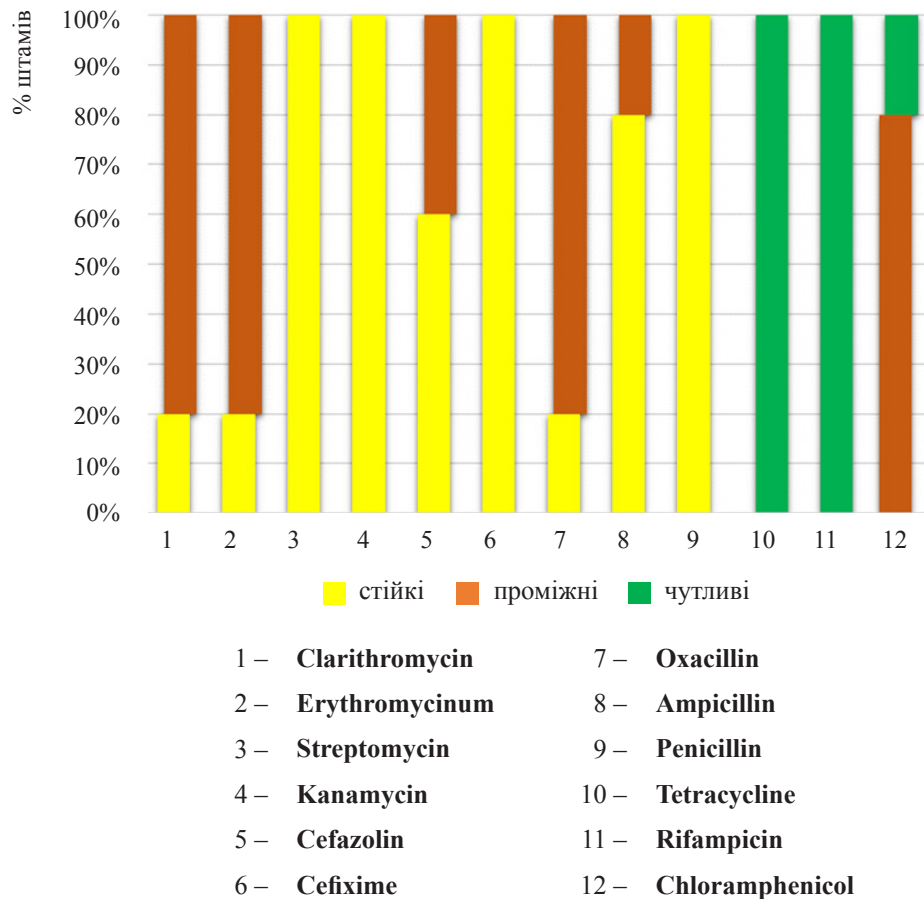


Рис. 5. Розподіл штамів *Lactococcus sp.*, які були ізольовані з чорноморських водоростей та мідій, в залежності від рівня резистентності до антибіотиків

Fig. 5. Percentage distribution of *Lactococcus sp.* strains isolated from Black Sea algae and mussels depending on antibiotic resistance level





коків отримані результати були порівняні з показниками, що характерні для представників роду *Enterococcus*, оскільки їх стали відносити до серйозних нозокоміальних умовних патогенів [3]. Цьому сприяє висока генетична пластичність цих бактерій, яка зумовлена наявністю у них множинних детермінант стійкості до антибіотиків. Крім природної резистентності ентерококів до ряду антибіотиків (аміноглікозиди, деякі цефалоспорини), встановлена їх висока резистентність до дезінфікувальних засобів і чинників зовнішнього середовища. Також показано, що патогенні властивості представників *Enterococcus* локалізовані в тих самих генетичних елементах, що кодують резистентність до антибіотиків [7].

Однак, порівнюючи стійкість до антибіотиків штамів родів *Lactobacillus* і *Enterococcus*, відмічено що, серед останніх було більше чутливих штамів до хлорамфеніколу, тетрацикліну, оксациліну і цефалоспоринів (рис. 1), ніж у представників роду *Lactobacillus* [1]. Крім того, частка штамів з проміжною чутливістю до кларитроміцину і канаміцину у штамів *Enterococcus* також була вищою, ніж у представників *Lactobacillus* [1].

Порівнюючи рівень резистентності бактерій *Enterococcus faecalis* і *Pediococcus pentosaceus*, можна помітити, що педіококи більш стійкі до каноміцину і цефазоліну. На відміну від ентерококів у представників *Pediococcus* присутні штами з проміжною стійкістю до хлорамфеніколу і тетрацикліну. Більша частка чутливих до антибіотиків штамів також була виявлена серед штамів *Pediococcus* (рис. 1 і рис. 2).

Взагалі, частка чутливих до антибіотиків штамів *Pediococcus pentosaceus* була малою. Приблизно 16,7% штамів були чутливими до еритроміцину, оксациліну, ампіциліну і тетрацикліну (рис. 2). До стрептоміцину, канаміцину, цефазоліну, цефіксиму і бензилпеніциліну чутливих штамів не виявлено (рис. 2).

Як відомо *Pediococcus spp.* зазвичай зустрічаються у мікробіоти в слизових оболонках людини і тварин, в молочних продуктах та на поверхнях рослин. Однак, вони все частіше визнаються як опортуністичні патогени, які викликають захворювання у людини. Скоріше за все бактерії *Pediococcus pentosaceus*, що були стійкими до антибіотиків, потрапили у морське середовище з суходолу.

При порівнянні резистентності до антибіотиків у представників *Streptococcus* і *Enterococcus* (рис. 1, рис. 3), відмічено відсутність серед *Streptococcus* штамів з проміжною резистентністю до кларитроміцину, стрептоміцину і канаміцину. При цьому до кларитроміцину і стрептоміцину реєстрували збільшення чутливих штамів. Усі штами *Streptococcus bovis* були стійкими до цефалоспоринів та тетрацикліну (рис. 3).

Важливим є той факт, що серед представників *Streptococcus* великою є частка бактерій стійких до антибіотиків групи пеніцилінів. Оскільки в США і Японії вже були зареєстровані перші резистентні до пеніциліну представники *Streptococcus* [17]. Отримані нами дані свідчать, що серед штамів *Streptococcus*, ізольованих відсоток стійких до макролідів становить 50,0%, до пеніцилінів від 25,0 до 75,0%% (рис. 3).

Досить специфічна антибіотикограма представників *Leuconostoc* ско-



ріш за все пов'язана з тим, що хоча ці мікроорганізми вважаються неінфекційними агентами у людей, однак, були клінічні повідомлення про те, що *Leuconostoc mesenteroides* може бути пов'язаним з певними захворюваннями людини, такими як абсцес мозку, ендокардит, порушення функціонування центральної нервової системи, туберкульозу [5].

Таким чином, проведені дослідження показали, що більшість молочнокислих коків, ізолюваних з морських водоростей та мідій, резистентні до одного або кількох антибіотиків, причому багато бактерій продемонстрували специфічні профілі стійкості до антибіотиків, які частково не відповідають літературним даним і можуть бути пояснені місцем виділення (морське середовище). Проведене дослідження показало наявність молочнокислих коків серед мікробіоти асоційованої з водоростями і мідіями, що є новою інформацією для цього регіону Чорного моря. Аналіз спектру стійкості до антибіотиків у ізолюваних штамів показав, що вони відрізняються за цією ознакою від типових представників молочнокислих коків ізолюваних з продуктів харчування або хворих людей і тварин.

**Н.Ю. Васильева, І.В. Страшнова, Е.В. Басюл,  
І.О. Ковтун, В.А. Іваниця**

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

## **УСТОЙЧИВОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ КОККОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЧЕРНОМОРСКИХ ВОДОРΟΣЛЕЙ И МИДИЙ К АНТИБИОТИКАМ**

### **Реферат**

*Целью работы является определение степени устойчивости к антибиотикам молочнокислых кокков, выделенных из черноморских мидий рода *Mytilus galloprovincialis* и водорослей. Методы. Классические микробиологические методы использовали для изучения культуральных и биохимических характеристик изолированных штаммов, что по совокупным показателям позволило отнести изолированные штаммы к родам *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*. Идентификацию до вида осуществляли на основании спектра жирных кислот методом газовой хроматографии с использованием автоматической системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock. На основании полученных результатов штаммы идентифицировали как виды *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus bovis* и *Leuconostoc mesenteroides*. Устойчивость к антибиотикам определяли диско-диффузным методом. Графическую обработку данных проводили по программе Microsoft Excel и R 3.4.0. Результаты. По результатам исследования показано, что большинство штаммов *Enterococcus* были устойчивыми к пенициллину (85,7%) и цефазолину (71,4%). Почти половина из них была устойчива и к рифампицину, цефиксиму и стрептомицину (42,9%). Представители *Pediococcus* были устойчивыми к пенициллину (83,3%), цефазолину (83,3%), канамицину (66,7%) и*



цефксиму (66,7%). 50,0% представителів *Pediococcus* були стійкими до тетрацикліну. Представителі *Streptococcus* були максимально стійкими до дії антибіотиків – процент стійких штамів коливався від 50,0% до 100,0% в залежності від антибіотика. Показателі стійкості до антибіотиків представителів *Leuconostoc* були достатньо варіативними і їх профіль відрізнявся від всіх інших молочнокислих кокків. Представителі *Lactococcus* були стійкими майже до всіх досліджуваних антибіотиків. **Висновки.** На основі отриманих даних показано, що більшість досліджуваних чорноморських штамів молочнокислих кокків, асоційованих з водоростями і мідіями мають природну резистентність до антибіотиків.

*Ключевые слова:* молочнокислые кокки, Черное море, водоросли, *Mytilus galloprovincialis*, антибиотики, резистентность

**N.Yu. Vasylieva, I.V. Strashnova, O. V. Basiul,  
I.O. Kovtun, V.O. Ivanytsia**

Odesa I.I. Mechnikov National University,  
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,  
tel.:+38 (0482) 68 79 64, e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

## **RESISTANCE OF LACTIC COCCI ISOLATED FROM BLACK SEA ALGAE AND MUSSELS TO ANTIBIOTIC**

### **Summary**

**The aim** of this work was determining the level of resistance to antibiotics of lactic acid cocci of the genus *Mytilus galloprovincialis* isolated from Black Sea algae and mussels. **Methods.** The classical microbiological methods were used to study the cultural and biochemical characteristics of the isolated strains. According to the total obtained data, the isolated strains were assigned to the genus *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*. Based on the obtained results, strains were identified as *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus bovis* u *Leuconostoc mesenteroides*. To determine resistance to antibiotic was used diffusion test. Graphic data processing was performed using Microsoft Excel and R 3.4.0. **Results.** According to the results of the study, it was shown that most strains of *Enterococcus* were resistant to penicillin (85.7%) and cefazolin (71.4%). Almost half of them were resistant to rifampicin, cefixime and streptomycin (42,9%). Representatives of the genus *Pediococcus* were resistant to penicillin (83.3%), cefazolin (83.3%), kanamycin (66.7%) and cefixime (66.7%). 50.0% of all strains of *Pediococcus* were resistant to tetracycline. Representatives of the genus *Streptococcus* were most resistant to antibiotics – the percentage of resistant strains ranged from 50.0% to 100.0% depending on the antibiotic. The antibiotic resistance of *Leuconostoc* representatives was quite variable and their profiles was different from all other lactic cocci. Representatives of *Lactococcus* were resistant to almost all antibiotics. **Conclusions.** Based on the obtained data, it was shown that most of the lactic acid cocci strains that were isolated from Black Sea algae and mussels of the genus *Mytilus galloprovincialis* were resistant to antibiotics.

*Key words:* lactic acid cocci, Black Sea, algae, *Mytilus galloprovincialis*, antibiotics, resistance



### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Васильєва Н.Ю., Страшнова І.В., Васильєв М.А., Метеліцина І.П. Стійкість бактерій роду *Lactobacillus*, ізольованих з чорноморських губок, до антибіотиків і важких металів// Мікробіологія і біотехнологія. – 2019. – № 47. – С. 58–77. doi.: [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2019.3\(47\).186592](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2019.3(47).186592)
2. Остапчук А.М. Молекулярно-біологічна характеристика и ідентифікація штаму *Vacillus sp.* ONU14 з ентомопатогенною активністю// Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 1. – С. 6–13. doi.: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/MiB\\_2015\\_1\\_4](http://nbuv.gov.ua/UJRN/MiB_2015_1_4)
3. Сычева М.В., Карташова О.Л., Щенитова Н.Е., Сафронов Ал.А. Антибиотикорезистентность бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из организма человека в норме и при патологии// Антибиотики и Химиотерапия.– 2016.– Т. 61. – С. 27–32.
4. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. Определитель бактерий Берджи. – Изд: Мир, 1997. – 800 с.
5. Barletta J., Estrada T., Rolyn M. J., Erbin M., Kaufman S., Perez H. Meningitis due to *Leuconostoc mesenteroides* associated with central nervous system tuberculosis: a case report. //Ann Clin Case Rep.– 2017.–Vol. 2. – article:1228.
6. Ben Omar N., Castro A., Lucas R., Abriouel H., Yousif N.M.K., Franz C.M.A.P., Holzapfel W.H., Perrez-Pulido R., Martinez-Cañamero M., Gralvez A. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. //Systematic and Applied Microbiology . – 2004. – Vol. 27.– P. 118–130. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00248>
7. Ben Sallem R., Klibi N., Klibi A. Antibiotic resistance and virulence of enterococci isolates from healthy humans in Tunisia. //Annals of Microbiology. – 2016. – Vol. 66 .– P. 717– 725. doi: [10.1007/s13213-015-1157-3](https://doi.org/10.1007/s13213-015-1157-3)
8. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. //Microbiol Mol Biol Rev – 2001. – Vol. 65. –P. 232–260. doi.: [10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001](https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001)
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial Wild Type Distributions of Microorganisms. <http://217.70.33.99/eucast2/> (28 February 2007, date last accessed).
10. Feedap E. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance // EFSA J.– 2012. – Vol. 10, No. 6.– Article ID 2740. doi: [10.2903/j.efsa.2012.2740](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740)
11. Flo'rez A.B., Ammor M.S., Mayo B. Identification of tet(M) in two *Lactococcus lactis* strains isolated from a Spanish traditional starter-free cheese made of raw milk and conjugative transfer of tetracycline resistance to lactococci and enterococci. //Int. J. Food Microbiol. – 2008. – Vol. 121. – P. 189–194. doi:[10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.029](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.029)
12. Gonzalez-Rodriguez I., Ruiz L., Gueimonde M., Margolles A., Sanchez B. Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract.// FEMS Microbiol. Lett. – 2013. – Vol. 340. – P. 1–10. doi.:[10.1111/1574-6968.12056](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12056)



13. Klare I., Werner G., Witte W. *Enterococci*. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. // Contributions to Microbiology. – 2001. – Vol. 8. – P. 108–122. doi.: 10.1159/000060406
14. Klare I., Konstabel C., Werner G., Huys G. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use// Journal of Antimicrobial Chemotherapy . – 2007. – Vol. 59. – P. 900– 912 doi:10.1093/jac/dkm035 Advance Access publicati
15. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications //Clin Infect Dis. – 2002. – Vol. 34. – P. 482–492. doi.: 10.1086/324626
16. Mathur S., Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. // Int. J. Food Microbiol. – 2005. – Vol. 105.– P. 281–295 doi.: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008
17. Shabayek S., Abdalla S. Macrolide- and tetracycline-resistance determinants of colonizing group B streptococcus in women in Egypt// Journal of Medical Microbiology. –2014. – Vol. 63. – P. 1324–1327 doi.: 10.1099/jmm.0.077057-0
18. van Hylckama Vlieg J.E., Rademaker J.L., Bachmann H., Molenaar D., Kelly W.J., Siezen R.J. Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. //Curr. Opin. Biotechnol. – 2006. – Vol.17. – P. 183–190 doi.: 10.1016/j.copbio.2006.02.007
19. van Reenen C. A., Dicks L. M. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities. A review. //Arch. Microbiol. – 2011. – Vol. 193. – P. 157–168 doi.: 10.1007/s00203-010-0668-3

## References

1. Vasylieva NYu, Strashnova IV, Vasyliiev MA, Metelitsyna IP. Resistance of *Lactobacillus* strains isolated from the Black sea sponges to antibiotics and heavy metal. Microbiology and Biotechnology.2019; 47:58-77 doi.: [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2019.3\(47\).186592](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2019.3(47).186592) [In Ukraine]
2. Ostapchuk AM. Molecular-biological characteristics and identification of Bacillus sp. ONU14 strain with entomopathogenic activity . Microbiology and Biotechnology. 2015; 1:6–13 [http://nbuv.gov.ua/UJRN/MiB\\_2015\\_1\\_4](http://nbuv.gov.ua/UJRN/MiB_2015_1_4) [In Ukraine]
3. Sycheva MV, Kartashova O L, Shchepitova NE, Safronov AIA. Antibiotic resistance of *Enterococci* isolated from healthy humans and patients with various pathologies. Antibiotics and Chemotherapy.2016;61:27-32 [In Russian]
4. Hoult J, Krieg N. Snit P. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. –Ed: Mir,1997. – 800 p. [In Russian]
5. Barletta J, Estrada T, Rolyn MJ, Erbin M, Kaufman S, Perez H. Meningitis due to *Leuconostoc mesenteroides* associated with central nervous system tuberculosis: a case report. Ann Clin Case Rep.2017; 2:Article:1228.



6. Ben Omar N, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif NMK, Franz CMAP, Holzapfel WH, Perrez-Pulido R, Martrinez-Cañamero M, Gralvez A. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology* . 2004; 27:118–130. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00248>
7. Ben Sallem R, Klibi N, Klibi A. Antibiotic resistance and virulence of enterococci isolates from healthy humans in Tunisia. *Annals of Microbiology*. 2016;66 : 717– 725. doi: 10.1007/s13213-015-1157-3
8. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001; 65: 232–260. doi.: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial Wild Type Distributions of Microorganisms. <http://217.70.33.99/eucast2/> (28 February 2007, date last accessed).
10. Feedap E. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance . *EFSA J*.2012;10(6):Article ID 2740. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2740
11. Flo´rez AB, Ammor MS, Mayo B. Identification of tet(M) in two *Lactococcus lactis* strains isolated from a Spanish traditional starter-free cheese made of raw milk and conjugative transfer of tetracycline resistance to lactococci and enterococci. *Int. J. Food Microbiol*. 2008; 121: 189–194. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.029
12. Gonzalez-Rodriguez I, Ruiz L, Gueimonde M, Margolles A, Sanchez B. Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett*. 2013; 340:1–10 doi.:10.1111/1574-6968.12056
13. Klare I, Werner G, Witte W. *Enterococci*. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. *Contributions to Microbiology*. 2001;8: 108–122. doi.: 10.1159/000060406
14. Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* . 2007; 59: 900– 912 doi:10.1093/jac/dkm035 Advance Access publication
15. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis*. 2002; 34:482–492. doi.: 10.1086/324626
16. Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *Int. J. Food Microbiol*. 2005; 105: 281–295 doi.: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008
17. Shabayek S, Abdalla S. Macrolide- and tetracycline-resistance determinants of colonizing group B streptococcus in women in Egypt. *Journal of Medical Microbiology*. 2014; 63: 1324–1327 doi.: 10.1099/jmm.0.077057-0
18. van Hylckama Vlieg JE, Rademaker JL, Bachmann H, Molenaar D, Kelly WJ, Siezen RJ. Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2006;17: 183–190 doi.: 10.1016/j.copbio.2006.02.007



19. van Reenen CA, Dicks LM. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities. A review. Arch. Microbiol. 2011; 193: 157–168 doi.: 10.1007/s00203-010-0668-3

Стаття надійшла до редакції 17.09.2020 р.



**Н.В. Титаренко, Н.І. Теслюк**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,  
e-mail: natalana@onu.edu.ua

## УДОСКОНАЛЕННЯ ПРОЦЕСІВ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ОЖИНИ ЗВИЧАЙНОЇ *RUBUS CAESIUS* L. СОРТУ ТОРНФРІ

**Мета роботи:** удосконалення первинних етапів мікроклонального розмноження Ожини звичайної *Rubus caesius* L. сорту Торнфрі, а саме введення у культуру *in vitro* для подальшого ефективного культивування. **Матеріали і методи.** Використовували методи введення ініціальних експлантів ожини в культуру *in vitro* і методи мікроклонального розмноження. Було випробувано дві схеми стерилізації рослинного матеріалу Ожини звичайної з використанням препаратів фунгіцидної дії «Хінозол» та «Хорус» для виявлення найоптимальнішого саме для даного виду рослин. Вивчали вплив концентрації агару у середовищі на процеси приживлюваності, проліферації бруньок та індукцію множинних пагонів Ожини звичайної і вперше використовували напіврідке середовище. Середовище готували напіврідким (4 г/л агару) та твердим (8г/л агару). **Результати.** Визначено оптимальну схему стерилізації рослинного матеріалу для введення Ожини звичайної в культуру *in vitro* та підібрано найбільш ефективний фунгіцидний препарат – «Хорус». Встановлено, що використання напіврідкого живильного середовища Мурасіге та Скуга для первинних етапів мікроклонального розмноження ожини в культурі *in vitro* дало можливість: підвищити приживлюваність експлантів порівняно з твердим середовищем на 30%; прискорити проліферацію пазушних бруньок на 1–2 дні; підвищити інтенсивність утворення додаткових пагонів ожини *in vitro* в 6–7 разів. **Висновок.** На первинних етапах мікроклонального розмноження Ожини звичайної *Rubus caesius* L. сорту Торнфрі доцільно використання напіврідкого живильного середовища для покращення приживлюваності експлантів, більш швидкої проліферації бруньок та утворення нових множинних пагонів у культурі *in vitro*.

**Ключові слова:** мікроклональне розмноження, Ожина звичайна, *Rubus caesius*, введення в культуру *in vitro*, ініціальний експлант

Мікроклональне розмноження рослин *in vitro* – культивування рослин в стерильних умовах на штучних живильних середовищах з регульованими параметрами навколишнього середовища. Це масове безстатеве розмноження, при якому отримані форми ідентичні вихідному генотипу [12].

У порівнянні з традиційними методами, мікроклональне розмноження рослин має низку переваг, а саме забезпечує високий коефіцієнт розмноження





рослин, скорочення термінів розмноження нових сортів рослин в 4–5 разів, виробництво здорового посадкового матеріалу, розмноження сортів, які погано розмножуються звичайним способом, тривале зберігання цінного генофонду, необхідність малої кількості вихідного матеріалу, мінімальних лабораторних площ [6].

Технологія мікроклонального розмноження рослин базується на послідовних етапах: відбір і стерилізація первинних експлантів; введення експлантів в культуру *in vitro*; проліферація бруньок і індукція розвитку пагонів; укорінення і розмноження мікроклонів на живильних середовищах і субстратах; адаптація рослин з умов *in vitro* до умов *in vivo* і дорощування саджанців до стандарту [1].

В останні роки серед населення збільшився інтерес до таких нетрадиційних видів культур, як ожина та малиново-ожинні гібриди. Насадження цих культур характеризуються великою урожайністю, ягоди – високими смаковими властивостями і, на відміну від поширеної в Україні малини, меншою мірою піддаються хворобам [12]. Наприклад, Ожина звичайна – харчова, медоносна, лікарська, кормова, фарбувальна, танідоносна, декоративна рослина [3].

Традиційно Ожина звичайна розмножуються верхівковими відводами, відприсками, корінними і зеленими черенками, розділенням куща. Перераховані способи мають низький коефіцієнт розмноження і не дають можливості звільнення рослин від вірусної інфекції [12]. У свою чергу, сучасні методи біотехнології дозволяють здійснити швидке розмноження нових форм, сортів та навіть поодиноких екземплярів рослин, які характеризуються цінними ознаками, і отримати оздоровлений посадковий матеріал. Мікроклональне розмноження широко застосовується для масового розмноження багатьох цінних плодово-декоративних видів: вишні, черешні, мигдаля, малини, грецького горіха та ін. [12].

Згідно з висновками багатьох дослідників [5, 7, 13], успіх мікроклонального розмноження багато в чому залежить від першого етапу відбору експланта і введення його в культуру, тобто правильного вибору вихідної рослини-донора, відбору експлантів та їх стерилізації, а також підбору та оптимізації складу живильного середовища, що забезпечує найвищий ріст і розвиток експлантів.

Відомо, що при виборі материнської донорної рослини необхідно враховувати її фізіологічні, сортові та видові особливості. Вихідні рослини мають бути здоровими, не ураженими грибковими, бактеріальними та вірусними хворобами, перебувати в стані інтенсивного росту. При виборі експланта враховують його вік, будову та походження.

Варіант стерилізації підбирається індивідуально для кожної культури і залежить від особливостей експланта. Зазвичай стерилізація складається з декількох етапів, що включають промивання мильним розчином, обробку хінозолом, фундазолом чи хорусом, розчином білизни, сулеми, різними засобами побутової хімії у різноманітних співвідношеннях. Успіх вибраної методики стерилізації визначається кількістю отриманого життєздатного матеріалу, придатного для подальшого мікророзмноження [12].



Живильне середовище для культивування також підбирають індивідуально. У літературних джерелах описано досвід використання середовища Гамборга В5 [12], QL, Андерсена [15] для розмноження плодово-декоративних культур. Однак найбільш широко застосовується середовище Мурасіге і Скуга (МС) в стандартній або половинній концентрації солей [17]. У живильне середовище на кожному етапі культивування вводяться різні фітогормони, і таким чином вдається досягти оптимальної швидкості вирощування і якості отриманих рослин [6].

Для мікроклонального розмноження Ожини звичайної найчастіше використовують фітогормон ІОК в концентрації 0,5–3 мг/л (ауксин) та 6-БАП в концентрації 0,5–5 мг/л (цитокінін) [11, 13]. Залежно від поставленої мети багато вчених рекомендують використовувати живильне середовище МС з невеликими модифікаціями співвідношення ауксин/цитокініни.

Незважаючи на популярність методу мікроклонального розмноження, не існує універсальної схеми культивування *in vitro* для Ожини звичайної сорту Торнфрі, немає єдиної думки щодо оптимальних схем стерилізації ініціальних експлантів, щодо впливу живильних середовищ. На сьогоднішній день все ще залишається потреба у розробці конкретних методик розмноження для певних видів та сортів рослин із врахуванням особливостей їх росту та метаболізму. У сучасних дослідженнях з мікроклонального розмноження Ожини звичайної не вивчався детально вплив консистенції живильного середовища на етапі введення ожини в культуру *in vitro*, та індукції множинних пагонів. Пошук та вирішення проблеми оптимальної схеми стерилізації рослинного матеріалу, консистенції живильного середовища є актуальним. В цьому напрямку у наших дослідженнях вперше запропоновано використовувати напіврідкі живильні середовища для розмноження Ожини звичайної сорту Торнфрі в культурі *in vitro*.

**Метою** даного дослідження було удосконалення первинних етапів мікроклонального розмноження Ожини звичайної *Rubus caesius L.* сорту Торнфрі, а саме введення у культуру *in vitro* для подальшого ефективного культивування.

### Матеріали та методи

Для введення у культуру використовували молоді однолітні слабо- або нездерев'янілі пагони Ожини звичайної з бруньками. Найкраща пора року для початку культивування – весна, коли рослина знаходиться у стадії активної проліферації, і тому ефективність процесів введення в культуру *in vitro* є найбільшою [5].

Відібрані пагони ожини перед стерилізацією розрізали на фрагменти до 7 см висотою та видаляли листки та прилистки у бруньок, щоб уникнути контамінації рослинного матеріалу і збільшити ефективність стерилізації. Покривні луски у бруньок не видаляли, тому що їх знищення значно знижує життєздатність експланту [9]. Розрізання необхідне для зручності розміщення пагонів у ємності для стерилізації, але варто зауважити, що необхідно контролювати розмір рослинних фрагментів для введення в культуру *in vitro* [16].



Правильна, ефективна обробка рослинного матеріалу на етапі введення в стерильну культуру є дуже важливою у мікроклональному розмноженні. У ході наших досліджень випробувано дві схеми стерилізації рослинного матеріалу та вивчано вплив різних фунгіцидних розчинів при стерилізації експлантів Ожини звичайної, відібраних з умов *in vivo*. Перша схема включала більше етапів дезінфікуючого впливу на експланти. До другої схеми не включена стадія обробки 70 % етанолом.

Підготовлений рослинний матеріал розміщали у скляній ємності для стерилізації та накривали двома шарами стерильної марлі. Перша випробувана схема стерилізації включала етапи:

- промивання у мильному розчині (10 хвилин);
- витримання у препараті фунгіцидної дії – Хінозол (15 хвилин);
- витримання у розчині білизни концентрацією 1:5 (8 хвилин);
- обробка 70% етанолом (15 секунд) [4].

Перед кожним наступним етапом здійснювали промивання рослинного матеріалу стерильною дистильованою водою, а після етанолу час промивання складав 10 хвилин.

Друга схема стерилізації складалася з таких стадій:

- промивання у мильному розчині (10 хвилин);
- витримання у препараті фунгіцидної дії – Хорус (15 хвилин);
- витримання у розчині білизни концентрацією 1:5 (8 хвилин).

Кожен наступний етап також супроводжували промиванням експлантів стерильною дистильованою водою [4].

Препарат Хінозол використовували у концентрації 2 г/л., а Хорус – 1,4 г/л.

Рослинний матеріал після кінцевого етапу знезараження переносили у стерильний ламінар-бокс, де і здійснювали введення Ожини звичайної у культуру *in vitro*. Перед роботою здійснювали стерилізацію ламінар-боксу ультрафіолетовим випромінюванням протягом 30 хвилин, а усі без виключення інструменти для маніпуляцій з рослинним матеріалом стерилізували у сухожаровій шафі при 180 °С протягом 60 хвилин.

Знезаражені фрагменти пагонів швидко, щоб уникнути їх обвітрювання, скальпелем розрізали на одновічкові відрізки. При цьому залишали частину стебла довжиною 0,3–0,5 см з обох боків від бруньки, і висаджували кожен експлант окремо в індивідуальну ємність з живильним середовищем, або парами, в залежності від кількості досліджуваного матеріалу.

Зазвичай для етапу введення в культуру *in vitro*, отримання пагонів та подальшого прискореного мікроклонального розмноження ягідних культур використовують тверді або рідкі живильні середовища. У даному дослідженні вивчали вплив консистенції живильного середовища на індукцію множинних пагонів ожини і використовували напіврідке середовище для введення Ожини звичайної в культуру *in vitro*. Середовища готували напіврідкими (4 г/л агару) та твердими (8г/л агару). За контроль слугувало тверде живильне середовище. Було запропоновано та апробовано для культури ожини напіврідке живильне середовище на основі середовища Мурасіге та Скуга (МС), модифіковане за кількісним та якісним складом вітамінів, фітогормонів, цукрози



[13, 14]. У середовище додавали 1 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП), 25 г/л сахарози. На твердому живильному середовищі експлант знаходився на поверхні середовища. Напіврідке середовище було напівпрозорим та кисілеподібним. Завдяки напіврідкій консистенції ініціальні експланти перебували у напівзануреному стані, що сприяло їх кращій взаємодії з цим середовищем порівняно з твердим середовищем [13].

Живильне середовище стерилізували шляхом автоклавування гарячою парою при 120 °С під тиском 0,5 атм.

Культивування введених у культуру експлантів здійснювали в умовах культуральної кімнати при температурі + 25 °С, інтенсивності освітлювання 2500 лк, відносній вологості 56–70% та фотоперіоді 16 годин – день, 8 годин – ніч.

Під час культивування проводили спостереження за станом ініціальних експлантів, проводячи облік приживлюваності, проліферації та кількості утворених пагонів. Утворені агрегати пагонів розчленовували на окремі пагони, і ці пагони пересаджували на середовище для укорінення з метою подальшого розмноження [5].

Важливе значення на цьому етапі мікроклонального розмноження мало співвідношення фітогормонів у середовищі, а також кількість цукрози [10]. В живильному середовищі знижували вміст вуглеводів до 20 г/л цукрози, а також дещо змінювали концентрацію фітогормонів: 1 мг/л 6-БАП та 1,5 мг/л ІОК.

Ті експланти, які під час культивування залишилися життєздатними та не виявили ознак зараження патогенами чи чужорідною мікробіотою, дорощували на середовищі МС до моменту, коли вони сформуєть 5–6 вузлів – даний розмір рослини дозволяв почати власне процес мікроклонального розмноження.

Усі експерименти виконувалися у трьох повторностях, по 10 мікроклонів на один експериментальний варіант. Статистичне опрацювання даних проводили згідно загальноприйнятих методів [2, 8]. Розрахунки здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel.

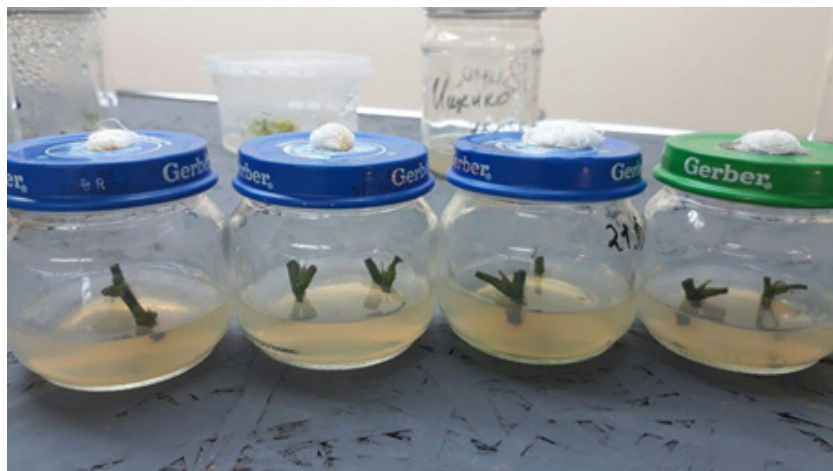
### Результати та їх обговорення

Під час введення Ожини звичайної в культуру *in vitro* (рис. 1) було впробувано дві схеми стерилізації рослинного матеріалу з метою виявлення найоптимальнішого саме для даного виду рослин.

При порівнянні приживлюваності ініціальних експлантів, стерилізованих за різними схемами (з розчином Хінозолу та розчином Хорусу), виявили, що найбільш високі показники приживлюваності були при проведенні стерилізації із використанням розчину препарату Хорус – тобто, по другому типу стерилізації.

При однакових умовах культивування приживлюваність ініціальних експлантів у варіанті із використанням схеми, де використовували препарат Хорус, була на 38% вищою (табл. 1) у порівнянні із використанням схеми із розчином Хінозолу.



Рис. 1. Введення експлантів Ожини звичайної в культуру *in vitro*Fig. 1. Introduction of Blackberry explants to *in vitro* culture

Таблиця 1

Приживлюваність ініціальних експлантів Ожини звичайної за різних умов стерилізації перед введенням у культуру *in vitro*

Table 1

Survival of initial Blackberry explants under different sterilization conditions before introduction to *in vitro* culture

Тип стерилізації	Приживлюваність, %*		
	3-й день від початку культивування	7-й день від початку культивування	14-й день від початку культивування
Перша схема стерилізації (Хінозол)	70,33 ± 4,08	59,66 ± 3,34	52,33 ± 3,34
Друга схема стерилізації (Хорус)	100,00 ± 0,00	92,21 ± 4,08	90,00 ± 5,56

Примітка – \* середні значення з дослідних повторностей, різниця є достовірною у всіх випадках при P=0,05

Note – \* average value of experimental repetitions, the difference is valid in all cases with P=0,05

При обробці по схемі із розчином Хінозолу 70% ініціальних експлантів Ожини звичайної в перші три дні культивування не виявляли жодних ознак інфікування чи контамінації, але, в подальшому, протягом тижня від початку культивування більша їх частина гинула. Також було відмічено велике виділення фенолів рослинами, тобто, можливо, розчин Хінозолу пошкоджує покриви та тканини експлантів.

При спостереженні за приживлюваністю та розвитком ініціальних експлантів Ожини звичайної, стерилізованими за схемою із використанням розчину Хорусу, заражень не виявили, виділення фенолів було набагато менше.

Приживлюваність ініціальних експлантів Ожини звичайної у цьому варіанті становила близько 90% (табл. 1).

Приблизно через 7 діб після введення на середовище у експлантів, стерилізованих за другою схемою, починалася активна проліферація пазухових бруньок (рис. 2). При цьому відмічено, що процеси проліферації пазухової бруньки починалися на 1–2 дні раніше, візуально експланти були зеленого кольору, без наявного побуріння базальної частини.



**Рис. 2.** Проліферація пазухових бруньок Ожини звичайної на 7-й день культивування після введення експлантів у культуру *in vitro*

**Fig. 2.** Proliferation of axillary buds of Blackberry on the 7th day of cultivation after introduction of explants to *in vitro* culture

Таким чином, вдалося досягти оптимального ефекту від стерилізації та зберегти більше життєздатних експлантів Ожини звичайної.

В результаті подальшої роботи було встановлено, що на показники приживлюваності меристемних верхівок та бруньок при введенні в культуру *in vitro* впливав склад живильного середовища, а також його консистенція.

У дослідженні вивчали вплив концентрації агару у середовищі, а саме консистенції живильного середовища на індукцію множинних пагонів і вперше для розмноження Ожини звичайної використовували напіврідке середовище (табл. 2). Було встановлено позитивний вплив напіврідкої консистенції середовища на показники приживлюваності ініціальних експлантів та їх розвитку.

Застосування напіврідкої консистенції середовища сприяло підвищенню приживлюваності експлантів в середньому на 30% порівняно із твердим середовищем МС.

Розпускання пазухової бруньки у ініціальних експлантів Ожини звичайної починалося в середньому на 2 дні раніше на середовищах із напіврідкою консистенцією, що є позитивним для прискорення процесу розмноження цінного рослинного матеріалу.

Дослідження дозволили зробити висновки щодо доцільності використання напіврідких живильних середовищ для індукції множинних пагонів Ожини звичайної *in vitro*.

Завдяки напіврідкій консистенції ініціальні експланти перебували у напівзануреному стані, що сприяло їх кращій взаємодії з цим середовищем

порівняно з твердим середовищем. Більша площа живлення створювала умови для кращої приживлюваності, проліферації бруньок та збільшення кількості утворених пагонів. Порівняно із твердим середовищем, використання напіврідкого дало можливість досягти кращої аерації експлантів, сприяло покращенню всіх показників, що відповідає отриманим раніше результатам на інших культурах рослин [13].

Таблиця 2

**Показники приживлюваності, проліферації та кількості утворених пагонів при введенні Ожини звичайної в культуру *in vitro* на середовищах МС різної консистенції\***

Table 2

**Indexes of survivability, proliferation and number of formed shoots during introduction of Blackberry to *in vitro* culture on MS media of different consistency\***

Тип живильного середовища	Приживлюваність, %	Проліферація бруньки, день від початку культивування**	Кількість утворених пагонів ожини, шт.
МС тверде	56,67 ± 4,56	7,02 ± 0,36	1,05 ± 0,13
МС напіврідке	87,08 ± 3,94	5,21 ± 0,28	6,85 ± 1,33

Примітка – \* середні значення з дослідних повторностей, різниця є достовірною у всіх випадках при P=0,05; \*\* кращими є більш ранні строки початку проліферації.  
Note – \* average value of experimental repetitions, the difference is valid in all cases with P=0,05; \*\* earlier proliferation is better.

На твердому живильному середовищі ініціальні експланти залишалися зеленуватого кольору, активно збільшувалися у розмірах, але на цьому середовищі досить часто спостерігалися прояви вітрифікації.

Згідно з проведеними дослідженнями, використання напіврідкого живильного середовища для первинних етапів введення Ожини звичайної в культуру *in vitro* дало можливість:

- підвищити приживлюваність експлантів порівняно з твердим середовищем на 30%;
- прискорити проліферацію пазушних бруньок на 1–2 дні;
- підвищити інтенсивність утворення пагонів ожини *in vitro* в 6–7 разів.

Надалі отримані мікроклони слугували основою для наступного мікроклонального розмноження і напрацювання рослинного матеріалу для адаптації (рис. 3).

При подальшому розмноженні Ожини звичайної в культуру *in vitro* використовували середовище з 20 г/л сахарози, 9 г/л агара, і концентрацією БАП 1 мг/л та ІОК 1,5 мг/л. Укорінення та розвиток мікроклонів на такому середовищі були ефективними і надалі рослини були придатними до адаптації.

Таким чином, в ході роботи розглянуто питання оптимізації процесів введення Ожини звичайної (*Rubus caesius* L.) сорту Торнфрі у культуру *in vitro* та вивчено особливості мікроклонального розмноження. Вдалося визначити



Рис. 3. Коренеутворення у мікроклонів Ожини звичайної при розмноженні в культурі *in vitro*

Fig. 3. Root formation in Blackberry microclones during propagated *in vitro*

оптимальну схему стерилізації рослинного матеріалу для введення Ожини звичайної в культуру *in vitro* із використанням ефективного фунгіцидного препарату – «Хорус». Встановлено доцільність використання напіврідкого живильного середовища для покращення приживлюваності, більш швидкої проліферації та утворення нових множинних пагонів Ожини звичайної у культурі *in vitro*.

**N. Tytarenko, N. Tesliuk**

Odesa National I.I. Mechnykov University,  
2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine,  
e-mail:natalana@onu.edu.ua

### **IMPROVEMENT OF THE PROCESSES OF MICROCLONAL REPRODUCTION OF BLACKBERRY *RUBUS CAESIUS* L. VAR. THORNFREE**

#### **Summary**

**Aim.** The initial stages' improvement of microclonal propagation of Blackberry *Rubus caesius* L. var. Thornfree, particularly the introduction to *in vitro* culture for subsequent effective cultivation. **Materials and methods.** Methods of introduction of initial explants of blackberry to *in vitro* culture and methods of microclonal reproduction were used. Two schemes of sterilization of plant material of Blackberry with the use of fungicidal drugs "Hinozol" and "Horus" were tested to identify the most optimal for this type of plants. The effect of agar concentration in the medium, the consistency of the nutrient medium on the processes of survivability, bud proliferation and induction of multiple shoots of Blackberry was studied, and semi-liquid medium was used for the first time. The medium was prepared semi-liquid (4 g/l of agar) and solid (8 g/l of agar). **Results.** The optimal





sterilization scheme of plant material for the introduction of Blackberry to in vitro culture was determined and the most effective fungicidal drug – "Horus" was selected. It was found that the use of semi-liquid Murashige and Skoog nutrient medium for the initial stages of microclonal propagation of Blackberry to in vitro culture allows:

- to increase the survival of explants by 30% compared to solid medium;
- to accelerate the proliferation of axillary buds for 1–2 days;
- to increase the intensity of the additional shoots formation of Blackberry in vitro in 6–7 times. **Conclusion.** During the initial stages of microclonal propagation of Blackberry *Rubus caesius* L. var. Thornfree, it is advisable to use semi-liquid nutrient medium to improve the survival of explants, faster proliferation of buds and the formation of new multiple shoots in vitro.

*Key words:* clonal micropropagation, Blackberry, *Rubus caesius*, introduction to in vitro culture, initial explant

**Н.В. Тигаренко, Н.И. Теслюк**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,  
e-mail: natalana@onu.edu.ua

## УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ЕЖЕВИКИ СИЗОЙ *RUBUS CAESIUS* L. СОРТА ТОРНФРИ

### Реферат

**Цель работы:** усовершенствование первичных этапов микроклонального размножения Ежевики сизой *Rubus caesius* L. сорта Торнфри, а именно введение в культуру *in vitro* для дальнейшего эффективного культивирования.

**Материалы и методы.** Использовали методы введения инициальных эксплантов ежевики в культуру *in vitro* и методы микроклонального размножения. Было опробовано две схемы стерилизации растительного материала Ежевики сизой с использованием препаратов фунгицидного действия «Хинозол» и «Хорус» для выявления оптимального именно для данного вида растений. Изучено влияние концентрации агара в среде и консистенции питательной среды на процессы приживаемости, пролиферации почек и индукцию множественных побегов ежевики, и впервые использована полужидкая среда. Среду готовили полужидкой (4 г/л агара) и твердой (8 г/л агара).

**Результаты.** Определена оптимальная схема стерилизации растительного материала для введения ежевики в культуру *in vitro* и подобран наиболее эффективный фунгицидный препарат – «Хорус». Установлено, что использование полужидкой питательной среды Мурасиге и Скуга для первичных этапов микроклонального размножения ежевики в культуре *in vitro* позволило:

- повысить приживаемость эксплантов по сравнению с твердой средой на 30%;
- ускорить пролиферацию пазушных почек на 1–2 дня;
- повысить интенсивность образования дополнительных побегов ежевики *in vitro* в 6–7 раз. **Вывод.** На первичных этапах микроклонального размножения Ежевики сизой *Rubus caesius* L. сорта Торнфри целесообразно ис-



пользование полужидкой питательной среды для улучшения приживаемости эксплантов, более быстрой пролиферации почек и образования новых множественных побегов в культуре *in vitro*.

*Ключевые слова:* микроклональное размножение, Ежевика сизая, *Rubus caesius*, введение в культуру *in vitro*, инициальные экспланты

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М. : Наука, 1964. – 272 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта с основами статистической обработки результатов исследований : Изд. 4-у. – М. : Колос, 1979. – 416 с.
3. Єлін Ю.Я., Зерова М.Я., Лушна В.І., Шабарова С.І. Дари лісів. – Київ : Урожай, 1979. – 440 с.
4. Зеленьанская Н.Н., Джабурия Л.В., Теслюк Н.І. Технология размножения винограда с использованием методов культуры тканей *in vitro* // Виноград. – 2009. – № 3. – С. 50–53
5. Иванова-Ханина Л. В. Оптимизация условий введения малины и ежевики в культуру *invitro*// Научный журнал КубГАУ. – 2014. – № 101. – С. 1–12.
6. Куликов И., Высоцкий В., Шипунова А. Биотехнологические приемы в садоводстве: экономические аспекты // Садоводство и виноградарство. – 2005 – № 5. – С. 24–27.
7. Мельничук М.Д., Григорюк І.П., Новак Т.В., Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В., Спиридонов В.Г., Клюваденко А.А., Антіпов І.О., Оверченко В.В. Біотехнологія рослин : практикум. – К., ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2012. – 215 с
8. Менчер Э. М., Земшман А. Я. Основы планирования эксперимента с элементами математической статистики в исследованиях по виноградарству. – Кишинев : Штиинца, 1986. – 238 с.
9. Решетова А.С., Тимофеева С.Н., Кашин А.С. Введение в культуру ежевики (*Rubuscaesius* L. subsp. *Eubatus* Focke, Rosaceae) сорта «Торнфри» // Бюл. Бот. сада СГУ. – 2012. – № 10. – С. 131–138.
10. Роговая В.В., Гвоздев М.А. Особенности микроклонального размножения косточковых культур в условиях *in vitro* // Известия РГПУ им. А.И. Герцена. // 2005. – № 13. – С. 291–302.
11. Сковородников Д.Н., Милехина Н.В., Орлова Ю.Н. Особенности клонального микроразмножения ежевики и малино-ежевичных гибридов // Вестник БГУ. – 2015. – № 3. – С. 417–419.
12. Таварткиладзе О. К., Вечернина Н. А. Размножение ежевики в культуре *in vitro* // Известия АлтГУ. – 2007. – № 3. – С. 28–30 .
13. Теслюк Н.І., Титаренко Н.В. Використання штамів *Bacillus megaterium* та *Enterococcus italicus* для мікроклонального розмноження рослин // Теорія і практика актуальних наукових досліджень : матеріали II Міжнарод. наук.-практ. конф. – Одеса, 28–19 квітня 2018. – С. 39–41.
14. Теслюк Н.І. Утворення множинних пагонів винограду в культурі *in vitro*



на різних живильних середовищах // Мікробіологія і біотехнологія. – 2018. – № 1. – С. 66–75

15. Широков А.І., Крюков Л.А. Основи біотехнології рослин : навчальний посібник. – Нижній Новгород : ННГУ, 2012. – 49 с.
16. Шорников Д. Г. Оптимизация условий культивирования *in vitro* ягодных и декоративных культур / Шорников Д.Г., Брюхина С.А., Муратова С.А. // Вестник ТГУ. – 2010. – № 2. – С. 640–645.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

### References

1. Butenko RG Culture of isolated tissues and physiology of plant morphogenesis. M.: Nauka, 1964:272 (in Russian)
2. Dospikhov VA. Field experiment technique with the basics of statistical processing of research results. M.: Kolos, 1979:416 (in Russian)
3. Yelin Yu, Zerova M, Lushpa V, Shabarova S. Gifts of forests. Kyiv: Urozhai, 1979:440 (in Russian)
4. Zelenyanskaya NN, Jaburia LV, Tesliuk NI. Technology of grape propagation using tissue culture methods *in vitro*. *VinoGrad*. 2009; 3:50-53 (in Russian)
5. Ivanova-Khanina LV. Optimization of conditions for the introduction of raspberries and blackberries to *in vitro* culture. *Scientific journal of KubSAU*. 2014; 101:1-12 (in Russian)
6. Kulikov I, Vysotsky V, Shipunova A. Biotechnological techniques in horticulture: economic aspects. *Horticulture and viticulture*. 2005; 5:24-27 (in Russian)
7. Melnichuk MD, Grigoryuk IP, Novak TV, Klyachenko OL, Kolomiets YV, Spiridonov VG, Klyuvadenco AA, Antipov IO, Overchenko VV. Plant biotechnology: workshop. Kyiv: Agrar Media Group LLC, 2012:215 (in Russian)
8. Mencher EM, Zemshman A. Basics of planning an experiment with elements of mathematical statistics in research on viticulture. Chisinau: Shtiintsa, 1986:238 (in Russian)
9. Reshetova AS, Timofeeva SN, Kashin AS. Introduction to the culture of blackberries (*Rubus caesius* L. subsp. *Eubatus* Focke, Rosaceae), varieties "Thornfree". *Bull. Bot. the garden of SSU*. 2012; 10:131-138 (in Russian)
10. Rogovaya VV, Gvozdev MA. Peculiarities of microclonal propagation of stone cultures *in vitro*. *Izvestiya RGPU im. A.I. Herzen*. 2005; 13:291-302 (in Russian)
11. Skovorodnikov DN, Milekhina NV, Orlova YN. Features of clonal micropropagation of blackberries and raspberry-blackberry hybrids. *Bulletin of BSU*. 2015; 3:417-419 (in Russian)
12. Tavartkiladze OK, Vechernina NA. Reproduction of blackberries in culture *in vitro*. *Izvestiya AltGU*. 2007; 3:28-30 (in Russian)
13. Tesliuk NI. Formation of multiple grape shoots in *in vitro* culture on different nutrient media. *Microbiology and biotechnology*. 2018; 1:66-75 (in Ukrainian)
14. Tesliuk NI, Tytarenko NV. The use of strains of *Bacillus megaterium* and



- Enterococcus italicus for microclonal plant propagation. Theory and practice of current research: materials II Int. sc.-pract. conf. Odesa, April 28-19, 2018, 39-41 (in Ukrainian)
15. Shirokov AI, Kryukov LA. Fundamentals of plant biotechnology: a textbook. Nizhny Novgorod: NNGU, 2012:49 (in Russian)
  16. Shornikov DG. Optimization of conditions for *in vitro* cultivation of berry and ornamental crops. Vestnik TSU. 2010; 2:640-645 (in Russian)
  17. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962; 15:473-497

Стаття надійшла до редакції 12.08.2020 р.



## ЮВІЛЕЇ І ДАТИ

### ДО 70-РІЧЧЯ ВІД ДНЯ НАРОДЖЕННЯ ФІЛІПОВОЇ ТЕТЯНИ ОЛЕГІВНИ



Видатному вченому Тетяні Олегівні Філіповій виповнилося 70 років з дня народження. Т.О. Філіпова доктор біологічних наук, професор, старший науковий співробітник, завідувачка кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Філіпова Тетяна Олегівна народилася 16 червня 1950 року у місті Одеса у родині військовослужбовців. Після закінчення середньої школи з золотою медаллю у 1967 році вступила до Одеського державного університету ім. І.І. Мечникова на біологічний факультет, спеціалізацію здобула на кафедрі біохімії. Впродовж років навчання була однією з найкращих студентів університету. У 1972 році після закінчення університету отримала диплом з відзнакою біолога, викладача біології і хімії.

Після закінчення університету (1972 р.) Т.О. Філіпова почала свою трудову діяльність на посаді старшого лаборанта кафедри біохімії Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. На посаду молодшого наукового співробітника переведена з 1.01.1973, старшого наукового співробітника з 1.05.1983, провідного наукового співробітника ПНДЛ-5 з 01.01.1998 .

Кандидатську дисертацію «Иммунофармакологическое исследование тилорона и ряда химических родственных соединений» за спеціальністю фармакологія Філіпова Тетяна Олегівна захистила у 1983 році, докторську дисертацію «Фармакологічна активність та деякі механізми дії нових синтетичних імуномодуляторів» за спеціальністю фармакологія у 1996 році .



Посаду професора кафедри мікробіології і вірусології Філіпова Тетяна Олегівна займає з 01.05. 2000 р.

Кафедру мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова професор Тетяна Олегівна Філіпова очолила у 2016 році.

Спектр наукових інтересів Філіпової Тетяни Олегівни пов'язаний з пошуком нових лікарських засобів та з'ясуванням механізмів їх дії.

На початку наукової діяльності Філіпова Тетяна Олегівна вивчала нові вітамінні комплекси. Згодом коло її наукових інтересів зосередилось у пошуку нових синтетичних імуномодуляторів, які можуть виявляти протипухлинну дію. Крім тілорону вона виявила нові структурні менш токсичні аналоги, які перевищували його за активністю.

Філіпова Тетяна Олегівна вперше показала, що синтетичні антрахінони є досить активними імуномодуляторами. Надалі вона займалася вивченням механізмів дії мембранотропних комплексонів з імуномодулювальною активністю.

На даний час Філіпова Т.О. вивчає фармакологічну дію нових синтетичних порфіринів і їх металокомплексів як засобів, які запобігають токсичній гіпербілірубінемії, впливають на мікроорганізми, є дуже перспективними фотодекстректорами. Вона продовжує вивчати вітчизняний синтетичний імуномодулятор аміксин як препарат, який би запобігав різним бактеріальним інфекціям та сприяв зниженню бактеріальної резистентності до антибіотиків. Впродовж останніх років Тетяна Олегівна зайнялася вивченням механізмів формування бактеріальної біоплівки та пошуком сполук, які її руйнують.

Філіпова Т.О. є науковим керівником багатьох науково-дослідних проєктів та зарубіжних грантів. Результати її наукових досліджень опубліковані у понад 200 наукових працях, 8 авторських свідоцтвах і 2 патентах.

Філіпова Тетяна Олегівна багато уваги приділяє науково-педагогічній та науково-організаційній діяльності, актуальним питанням навчального процесу. Її педагогічна діяльність є надзвичайно плідною. Тетяна Олегівна підготувала п'ять кандидатів наук та багатьох магістрів, які працюють у науково-дослідних центрах України, Швеції, Франції.

Філіпова Тетяна Олегівна талановитий лектор, вона користується заслуженою пошаною та повагою студентів та аспірантів.

Протягом багатьох років Т.О. Філіпова є заступником голови спеціалізованої вченої ради Д 41.051.06 по захисту докторських дисертацій в Одеському національному університеті імені І.І. Мечникова, членом спеціалізованої вченої ради Д 41.600.01 по захисту докторських дисертацій в Одеському національному медичному університеті.

Т.О. Філіпова бере активну участь у громадській роботі, є членом Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, Спільки Біологів та біотехнологів Одеси, Українського біохімічного товариства, Асоціації фармакологів України.

Філіпова Тетяна Олегівна є членом редакційної колегії «Вісника Одеського національного університету. Серія Біологія», та заступником головного



редактора наукового журналу «Мікробіологія і біотехнологія», який включено до Переліку фахових видань України, зареєстровано у ISSN та включено до науково-метричної бази Індекс Копернікус та інших науково-метричних баз.

Тетяна Олегівна Філіпова активна, енергійна але дуже скромна людина, яка користується великою повагою та авторитетом у колег, друзів та учнів. Їй притаманні професіоналізм, відданість обраній справі, висока працездатність. Вона високоерудована людина, яка не обмежує свої інтереси наукою, захоплюється художньою літературою та класичною музикою.

За плідну наукову та педагогічну діяльність Філіпова Т. О. неодноразово була нагороджена почесними грамотами Академії НАН України, Одеського Національного університету імені І. І. Мечникова. Тетяна Олегівна Філіпова нагороджена відзнакою МОН Відмінник освіти.

Щиро вітаємо Тетяну Олегівну з ювілеєм та від усього серця бажаємо їй міцного здоров'я, творчої наснаги, нових наукових здобутків, успішних звершень і щасливого довголіття.

*Колективи співробітників:  
біологічного факультету  
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова,  
кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології  
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова,  
редколегії наукового журналу «Мікробіологія і біотехнологія»,  
Спілки Біологів та біотехнологів Одеси*



## ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

**Тематична спрямованість:** мікробіологія, вірусологія, імунологія, молекулярна біотехнологія, створення та селекція нових штамів мікроорганізмів, мікробні препарати, антимікробні засоби, біосенсори, 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:** «Оглядів та теоретичні статті», «Експериментальні праці», «Дискусії», «Короткі повідомлення», «Хроніка наукового життя», «Сторінки історії», «Ювілеї і дати», «Рецензії», «Книжкова полиця».

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

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

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

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

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

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

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





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

- Реферат англійською мовою:

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

- Повний текст статті мовою оригіналу.

**Текст статті має включати такі складові:**

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

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

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

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

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

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



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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то абревіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Посилання на літературу подаються у тексті статті, цифрами у квадратних дужках, згідно з порядковим номером у списку літератури.

### Розділ «Матеріали і методи»:

- Методи дослідження та схеми експерименту мають бути представлені так, щоб їх можна було відтворити.
- Для використаних реактивів та матеріалів вказати назву компанії та країни-виробника.
- Одиниці вимірювання вказати в системі СІ.
- Концентрацію розчинів представляти в М, мМ, мкМ (молярна концентрація).
- Молекулярку масу (Мм) – Да (дальтони) або кДа.
- При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.
- Активність ферментів виражають в мкмолях використаного субстрату або утвореного продукту за 1 хв на 1 мг протеїну або використати стандартну одиницю активності U (IU) і катал (скорочено кат), питома активність ензиму виражається в ммоль/хв на 1 мг протеїну або в од.акт/мг, кат/кг.
- Вказати умови проведення ферментативної реакції (температура, рН, концентрація субстрату).
- Вказати використані методи статистичного аналізу, програму статистики.

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

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

До рисунків мають бути підписи не згруповані з ним і не вставлені в об'єкт рисунка.

Позначення на рисунку мають бути інтегровані в нього, тобто копіюватися разом з рисунком, а не окремими частинами.

Всі ілюстрації мають бути розміщені в файлі рукопису, також обов'язково додані до електронного варіанту у вигляді файлів формату JPEG.

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



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

### **Список використаної літератури**

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

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

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

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

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

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

Назви статей наводять англійською мовою.

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

### **Зразки посилання літератури**

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

#### **На книги**

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

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

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

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

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

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

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

#### **На журнальні статті**

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



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

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

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

#### **На тези доповідей**

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

#### **На депоновані наукові роботи**

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

#### **На стандарти**

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

#### **На автореферати дисертацій**

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

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

##### **References**

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

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

##### **Статті в журналах:**

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

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

##### **Книги:**

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

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

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

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

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



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

Усі права захищені згідно законодавства України.

*Верстка С. О. Остапенко*

Підписано до друку 23.09.2020 р. Формат 70x100/16.  
Ум.-друк. арк. 7,64. Тираж 100 пр.  
Зам. № 2144.

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