

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

№ 3(56)
2022

Одеса
ОНУ
2022

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), Г. О. Іутинська (Київ, Україна), Л. В. Капрельянц (Одеса, Україна),
І. К. Курдиш (Київ, Україна), І. П. Метеліцина (Одеса, Україна), Ф. Моцці (Тукуман, Аргентина),
І. І. Панчук (Чернівці, Україна), М. В. Пати́ка (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.uran.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, 2022

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),
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, 2022

ЗМІСТ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

| | |
|--|----|
| І.В. Страшнова, К.С. Потапенко, Н.В. Коротаєва, Г.В. Лісютін, І.П. Метеліцина АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЧОРНОМОРСЬКИХ СТРЕПТОМІЦЕТІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ОБРОСТАНЬ ЧЕРЕПАШНИКУ І МІДІЙ | 6 |
| Н.І. Теслюк, М.Л. Литвин, Т.В. Гудзенко ОПТИМІЗАЦІЯ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПЕРВИННИХ ЕТАПІВ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ <i>IN VITRO</i> ВОЛОСЬКОГО ГОРІХУ | 24 |
| ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ | 34 |

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

**I.V. Strashnova, K.S. Potapenko, N.V. Korotaeva,
G.V. Lisyutin, I.P. Metelitsyna**

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF THE BLACK SEA STREPTOMYCETES
ISOLATED FROM THE FOULING OF SHELL ROCK
AND MUSSELS 6

N.I. Tesliuk, M.L. Lytvyn, T.V. Hudzenko

OPTIMIZATION OF THE NUTRIENT MEDIUM FOR THE PRIMARY
STAGES OF *JUGLANS REGIA* MICROCLONAL PROPAGATION
IN VITRO 24

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS 34

**І.В. Страшнова, К.С. Потапенко, Н.В. Коротаєва,
Г.В. Лісютін, І.П. Метеліцина**

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

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЧОРНОМОРСЬКИХ СТРЕПТОМІЦЕТІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ОБРОСТАНЬ ЧЕРЕПАШНИКУ І МІДІЙ

Швидке набуття резистентності бактеріальними і грибовими патогенами є серйозною проблемою в системі охорони здоров'я, що зумовлює пошук в різних екологічних нішах нових перспективних продуцентів протимікробних природних продуктів. **Мета.** Визначити антагоністичну активність стрептоміцетів, виділених із біологічних обростань природного черепашику і мідій Одеської затоки Чорного моря. **Методи.** Досліджено антагоністичну активність 19 і 14 штамів стрептоміцетів, виділених, відповідно, із обростань черепашику і мідій Одеської затоки. Стрептоміцети попередньо культивували на агаризованих середовищах Гаузе 1, Гаузе 2 і вівсяному агарі з морською сіллю (2%) при температурі 30 °С протягом 10 днів. Антагоністичну активність щодо 12 тест-культур визначали методом агарових блоків. **Результати.** Усі виділені морські стрептоміцети є антагоністами хоча б до одного штаму індикаторного мікроорганізму. Антибіотична активність залежала від джерела виділення стрептоміцетів, середовища культивування і властивостей конкретних штамів продуцентів і тест-культур. Найчутливішими до усіх стрептоміцетів із черепашику проявили після культивування на середовищі Гаузе 1, а стрептоміцети із мідій – після культивування на середовищі Гаузе 2. Зони відсутності росту чутливих індикаторів коливалися від 12,4±0,3 мм до 20,6±0,2 мм (під впливом стрептоміцетів із черепашику) і від 12,4±0,2 мм до 39,7±0,2 мм (під впливом стрептоміцетів із мідій). *Streptomyces sp. Lim 2.2* (штам із черепашику) пригнічував ріст 8-ми тест-культур, а штами із мідій *Streptomyces spp. Myt 4b* і *Myt 7ch* – 10-и. Найчутливішими до усіх стрептоміцетів були індикаторні штами грампозитивних бактерій, зокрема найбільше пригнічувався метаболітами *Streptomyces spp. Myt 12a* і *Myt 12b* штам *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **Висновки.** Антагоністична активність стрептоміцетів, ізольованих із Чорного моря, залежала від джерела виділення, середовища попереднього культивування і властивостей штамів продуцентів і індикаторних мікроорганізмів. Найбільшу активність штами стрептоміцетів із черепашику і мідій проявили після попереднього культивування, відповідно, на середовищах Гаузе 1 і Гаузе 2 щодо грампозитивних бактерій. Найкращий антибіотичний потенціал виявлено у штамів *Streptomyces spp. Lim 2.2, Lim 4, Lim 5.1* і *Lim 7.2*, виділених із обростань черепашику, і штамів *Streptomyces spp. Myt 7b, Myt 7ch, Myt 12a* і *Myt 12b*, виділених із мідій.

Ключові слова: морські стрептоміцети, антагоністична активність, індикаторні мікроорганізми



Впровадження антибіотиків породило великі сподівання щодо перспектив боротьби із хворобами, спричиненими патогенними мікроорганізмами [7]. З часом занадто широке, не завжди обґрунтоване і адекватне призначення антибіотиків призвело спочатку до появи антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів, а згодом і збільшення їх кількості, що, у свою чергу, сприяє поширенню інфекційних захворювань. Окрім цього масштабному розповсюдженню резистентності до антибіотиків сприяє антропогенна діяльність [28].

Швидке набуття резистентності бактеріальними і грибовими патогенами є серйозною проблемою в системі охорони здоров'я навіть розвинених країн [12]. З 2020 року Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) попереджає про дефіцит інноваційних антибіотиків та їх небезпеку при лікуванні інфекцій, що викликані стійкими до антибіотичних препаратів мікроорганізмами [13, 30, 31]. Тому для боротьби з постійною появою мультирезистентних патогенів існує критична і постійна потреба у відкритті нових протимікробних природних продуктів [12].

Основним джерелом отримання нових антибіотичних сполук залишаються мікроорганізми, більшість з яких це культурабельні представники філуму *Actinobacteria*, серед яких провідну роль відіграють ґрунтові актинобактерії роду *Streptomyces* (до 70% відомих антибіотиків є вторинними метаболітами стрептоміцетів) [8, 12, 18, 22]. Однак, за останні 20 років повторне відкриття раніше охарактеризованих антибіотиків і надлишковість штамів знизили інтерес до ґрунтових стрептоміцетів, як до джерела нових біоактивних сполук [11, 13]. Актинобактерії, мешканці морського середовища (морських відкладень, коралових рифів, безхребетних тощо), набули цінності завдяки своєму хеморізноманіттю, включаючи продукцію численних біоактивних вторинних метаболітів [10, 17], що залежить від їх середовища з екстремальними коливаннями тиску, солоності, світла і температури [14]. Було показано, що морські актинобактерії демонструють більш різноманітні та кращі властивості порівняно з наземними актинобактеріями щодо антибактеріальних, антигрибкових, антибіоплівкових, антикоагулянтних та протівірусних ефектів [13, 24].

Метою роботи було визначити антагоністичну активність стрептоміцетів, виділених із біологічних обростань природного черепашнику і мідій Одеської затоки Чорного моря.

Матеріали і методи

У дослідженні використано штами актинобактерій, виділені із біологічних обростань природного черепашнику і мідій (*Mytilus galloprovincialis*), зібраних у червні–липні 2020 р. в Одеській затоці Чорного моря (м. Одеса, Україна, 46°27'01''N 30°46'14''E) [6, 9]. Виділені із обростань черепашнику (19 штамів) і мушлей мідій (14 штамів) актинобактерії за результатами порівняння жирнокислотних спектрів з використанням бібліотеки MIDISherlock (ACTIN 3.80) з різними індексами подібності були ідентифіковані як представники роду *Streptomyces* [5].



Для вивчення антагоністичної активності штами стрептоміцетів вирощували поверхнево на агаризованих середовищах Гаузе 1, Гаузе 2 і вівсяний агар з морською сіллю (2%) при температурі 30 °С протягом 10 днів [2].

В експерименті використано тест-штами індикаторних мікроорганізмів, представлених грампозитивними, грамнегативними бактеріями і дріжджоподібним грибом *Candida albicans* ATCC 18804. Штами грампозитивних бактерій – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kocuria rhizophila* DSM 348; грамнегативних бактерій – *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas putida* KT 2440. Штами індикаторних мікроорганізмів попередньо культивували протягом 24 год у поживному бульйоні (GranuCult® Nutrient Broth, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) при 37 °С (бактерії) і у рідкому середовищі Сабу-ро (NutriSelect® Plus Sabouraud-2% Dextrose Broth, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) при 30 °С (*C. albicans*).

Визначення антагоністичної активності проводили на середовищі LB (LB broth (MILLER) for Microbiology (Merck), Darmstadt, Germany) із 0,7% вмістом агар-агару методом блоків. Для цього агарові блоки 10-ти добових культур стрептоміцетів розкладали на попередньо засіяну добовою культурою тест-штаму (10^9 клітин/мл) поверхню середовища у чашках Петрі. На кожну засіяну чашку поміщали по 6 блоків випробуваних стрептоміцетів на однаковій відстані один від одного і від краю чашки. Облік результатів здійснювали після інкубації при оптимальних для кожної групи мікроорганізмів температурах через 24 год (для бактерій) і 48 год (для *C. albicans*), вимірюючи розміри зон відсутності росту індикаторних штамів навколо блоків зі стрептоміцетами [3].

Опрацювання отриманих результатів здійснювали за допомогою програми Microsoft Office Excel-2016. Визначали такі статистичні показники, як середнє арифметичне значення (M), стандартну похибку (m). Достовірність відмінностей між середніми значеннями встановлювали за t-критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95% ($p \leq 0,05$).

Результати та їх обговорення

Дослідження антагоністичних властивостей актинобактерій роду *Streptomyces*, виділених із біологічних обростань черепашику і мідій, показало, що хоча б до одного індикаторного мікроорганізму активність проявили всі вивчені штами, що є свідченням антибіотичного потенціалу морських стрептоміцетів. З іншого боку, аналізуючи отримані результати, зауважимо варіабельність цієї ознаки і її залежність від багатьох чинників. Зокрема, на прояв антагоністичної активності стрептоміцетів (що полягало як в кількості чутливих індикаторів так і в розмірах зон пригнічення їх росту) впливало середовище попереднього культивування, джерело виділення, властивості конкретного штаму як продуцента, так і індикатора.

У таблицях 1 і 2 наведено результати визначення антагоністичної активності для штамів стрептоміцетів, виділених із біологічних обростань



черепашнику, після попереднього культивування на середовищі Гаузе 1, і стрептоміцетів, виділених із обростань мушлей мідій, після попереднього культивування на середовищі Гаузе 2, оскільки саме після вирощування на цих середовищах продуценти із вказаних джерел виділення проявили найбільшу активність щодо усіх індикаторів. Зони відсутності росту чутливих індикаторних мікроорганізмів за дії стрептоміцетів із черепашнику і мідій після попереднього культивування на вказаних середовищах коливалися від $12,4 \pm 0,3$ мм до $20,6 \pm 0,2$ мм і від $12,4 \pm 0,2$ мм до $39,7 \pm 0,2$ мм, відповідно.

Після попереднього культивування на середовищі Гаузе 1 усі виділені із черепашнику штами *Streptomyces* проявили пригнічувальну дію хоча б до одного індикатора. Виявлено 4 штами (що склало 21,1% від усіх виділених із черепашнику), що перешкоджали росту лише однієї тест-культури, 31,6% штамів запобігали росту 2-х тест-мікроорганізмів (табл. 1, рис. 1). У цей же час штам *Streptomyces* sp. Lim 2.2 згубно діяв на ріст 8 індикаторних мікроорганізмів.

Середовище Гаузе 1 є мінеральним, відносно бідним на джерела живлення. Можливо, саме цей фактор спонукав виділені із черепашнику стрептоміцети до синтезу протимікробних речовин відносно використаних індикаторів. Тобто в умовах дефіциту поживних речовин продукція різноманітних вторинних метаболітів може розглядатися як захисна адаптивна реакція.

У цей же час штами, виділені із мідій, кращу активність проявили після попереднього культивування на органічному середовищі Гаузе 2. При цьому лише один штам стрептоміцетів (*Streptomyces* sp. Myt 8b) пригнічував ріст одного індикатора (*P. putida* КТ 2440) (табл. 2, рис. 2). Інші виділені із мідій штами запобігали росту більшої кількості тест-культур. Два штами (14,3% від усіх виділених із мідій) – *Streptomyces* spp. Myt 4b і Myt 7ch – були антагоністами 10 індикаторів.

Для накопичення вторинних метаболітів мікроорганізмами велике значення має якісна характеристика окремих компонентів живильних середовищ для попереднього культивування [1, 23, 29]. Значно впливають на утворення антибіотичних речовин мікроорганізмами джерела нітрогену [16, 19]. Зазвичай у середовищах для культивування мікроорганізмів джерелами нітрогену є солі нітратної або рідше солі нітритної кислоти, амонійні солі органічних або неорганічних кислот, або амінокислоти, білки та продукти їх гідролізу. Як джерело карбону використовуються дишукриди, полішукриди, спирти та органічні кислоти. На одних джерелах карбону ріст продуцентів та біосинтез антибіотичних речовин відбувається добре, на інших – мікроорганізми або не розвиваються, або не синтезують антибіотики [15, 25, 27]. При біосинтезі більшості продуктів обміну речовин мікроорганізмів до складу середовищ входять неорганічні фосфоровмісні сполуки у вигляді йонів фосфату. Вони необхідні для росту мікроорганізмів та синтезу багатьох життєво важливих сполук [20].

Отже, на наш погляд, отримання антагоністично активних штамів досить часто залежить і визначається джерелом ізоляції, оскільки в природних умовах конкуренції за джерела живлення перевагу мають мікроорганізми з кращою антибіотичною здатністю. А на прояв антагоністичних властивостей



Таблиця 1
 Зони відсутності росту індикаторних мікроорганізмів (мм) за впливу стрептоміцетів із черепашки після попереднього культивування на середовищі Гаузе 1

Table 1
 Zones of growth inhibition of indicator microorganisms (mm) under the influence of streptomycetes from shell rock after pre-cultivation on Gauze 1 medium

| Штам <i>Streptomyces</i> spp. | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|---|----------|---|----------|----------|----------|----------|
| 1 | | | | | | | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 14,3±0,2 | 16,4±0,2 | 14,9±0,1 | 16,8±0,2 | 14,3±0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lim 2.1 | | | | | | | | | | | | |
| Lim 2.2 | 16,5±0,2 | 20,3±0,4 | 17,5±0,2 | 20,6±0,2 | 16,1±0,2 | 0 | 0 | 0 | 14,5±0,2 | 14,9±0,2 | 14,2±0,2 | 0 |
| Lim 3.1 | 0 | 18,2±0,3 | 0 | 13,6±0,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15,4±0,2 | 13,3±0,2 | 0 |
| Lim 3.2 | 0 | 0 | 15,7±0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lim 3.3 | 13,2±0,1 | 0 | 0 | 13,7±0,2 | 0 | 0 | 14,2±0,2 | 0 | 14,8±0,2 | 14,3±0,3 | 14,3±0,1 | 0 |
| Lim 3.4 | 0 | 18,2±0,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15,6±0,2 | 0 | 0 |
| Lim 4 | 0 | 0 | 16,5±0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18,4±0,3 |
| Lim 5.1 | 0 | 0 | 15,2±0,3 | 16,3±0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |



Продовження таблиці

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|----------|----------|----------|----------|----------|---|----------|---|---|----------|----------|----------|----|
| Lim 5.2 | 0 | 0 | 0 | 14,4±0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lim 6.1 | 0 | 13,8±0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13,2±0,1 | 0 | 0 |
| Lim 6.2 | 14,5±0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14,5±0,2 | 0 |
| Lim 7.1 | 0 | 0 | 0 | 15,6±0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13,4±0,2 | 13,7±0,2 | 0 |
| Lim 7.2 | 14,3±0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14,3±0,2 | 0 | 0 | 14,6±0,3 | 14,4±0,2 | 16,4±0,2 | 0 |
| Lim 9.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14,3±0,1 | 0 | 0 |
| Lim 9.2 | 0 | 0 | 0 | 16,5±0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15,4±0,2 | 0 |
| Lim 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13,3±0,2 | 0 | 0 |
| Lim 12.1 | 0 | 15,8±0,1 | 15,3±0,2 | 13,3±0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lim 12.2 | 15,4±0,2 | 0 | 16,5±0,2 | 14,6±0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14,5±0,2 | 14,5±0,2 | 14,6±0,1 | 0 |
| Lim 12.3 | 0 | 15,1±0,2 | 15,7±0,3 | 15,2±0,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lim Sb. | 14,3±0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14,4±0,1 | 12,4±0,3 | 14,8±0,2 | 0 |

Таблиця 2
 Зони відсутності росту індикаторних мікроорганізмів (мм) за впливу стрептоміцетів із мідій після попереднього культивування на середовищі Гаузе 2

Table 2
 Zones of growth inhibition of indicator microorganisms (mm) under the influence of streptomycetes from mussels after pre-cultivation on Gauze 2 medium

| Штам <i>Streptomyces</i> <i>spp.</i> | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|--|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 1 | | | | | | | | | | | | |
| Myt 1 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>M. luteus</i> ATCC 4698 | <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | <i>K. rhizophila</i> DSM 348 | <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>P. vulgaris</i> ATCC 6896 | <i>S. enterica</i> NCTC 6017 | <i>K. pneumoniae</i> ATCC 131 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>P. putida</i> KT 2440 | <i>C. albicans</i> ATCC 18804 |
| Myt 2 | 13,6±0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14,2±0,1 | 0 | 15,6±0,2 | 14,7±0,2 | 15,6±0,3 | 0 | 0 |
| Myt 3a | 15,5±0,3 | 26,6±0,2 | 0 | 29,7±0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Myt 3b | 18,7±0,1 | 21,2±0,1 | 0 | 29,4±0,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Myt 4b | 0 | 20,1±0,1 | 0 | 23,5±0,2 | 0 | 0 | 13,4±0,4 | 0 | 0 | 0 | 12,5±0,2 | 0 |
| Myt 5 | 12,5±0,1 | 15,5±0,2 | 0 | 14,6±0,2 | 0 | 13,6±0,2 | 13,0±0,2 | 14,2±0,1 | 14,3±0,1 | 14,7±0,2 | 14,3±0,1 | 14,4±0,1 |
| Myt 6 | 16,3±0,1 | 29,7±0,5 | 0 | 19,4±0,3 | 13,5±0,2 | 23,4±0,2 | 0 | 0 | 21,0±0,3 | 0 | 17,4±0,2 | 16,5±0,2 |
| Myt 7b | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15,5±0,3 | 0 | 13,5±0,2 | 13,6±0,3 | 0 | 0 | 0 |
| Myt 7b | 18,6±0,3 | 32,6±0,2 | 0 | 26,7±0,2 | 14,1±0,1 | 22,4±0,3 | 0 | 0 | 23,6±0,2 | 0 | 18,5±0,3 | 15,4±0,1 |



Продовження таблиці

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Myt 7ch | 18,5±0,2 | 29,7±0,2 | 0 | 22,8±0,1 | 14,9±0,1 | 21,2±0,3 | 13,7±0,2 | 13,0±0,1 | 24,3±0,2 | 0 | 22,2±0,2 | 14,9±0,2 |
| Myt 8b | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12,5±0,2 | 0 |
| Myt 10 | 12,8±0,2 | 14,7±0,2 | 0 | 13,2±0,2 | 0 | 13,2±0,2 | 13,6±0,3 | 0 | 13,6±0,4 | 13,2±0,3 | 13,7±0,2 | 0 |
| Myt 11 | 12,4±0,2 | 14,4±0,1 | 16,7±0,3 | 14,2±0,1 | 0 | 14,2±0,2 | 0 | 13,6±0,3 | 14,8±0,2 | 0 | 0 | 0 |
| Myt 12a | 29,4±0,1 | 39,7±0,2 | 17,4±0,4 | 30,7±0,4 | 28,4±0,2 | 0 | 0 | 0 | 21,5±0,4 | 0 | 0 | 0 |
| Myt 12b | 28,3±0,3 | 36,7±0,2 | 19,3±0,3 | 33,7±0,3 | 27,0±0,3 | 0 | 13,5±0,2 | 0 | 24,6±0,4 | 13,5±0,2 | 0 | 0 |

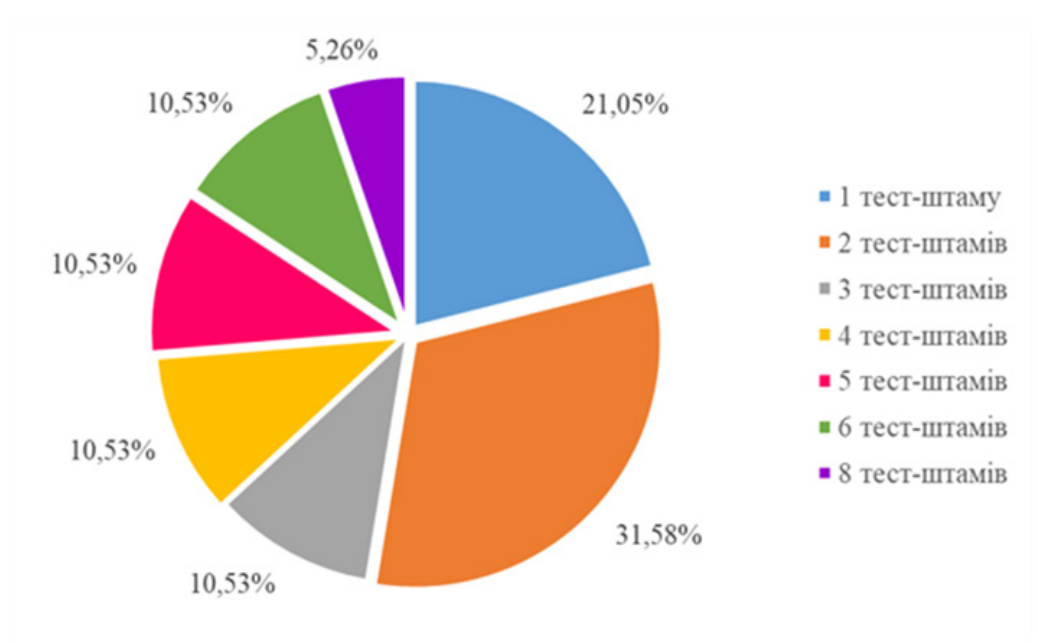


Рис. 1. Частка антагоністично активних штамів стрептоміцетів, виділених із черепашнику, після попереднього культивування на середовищі Гаузе 1

Fig. 1. Proportion of antagonistically active strains of streptomycetes isolated from shell rock after pre-cultivation on Gauze 1 medium

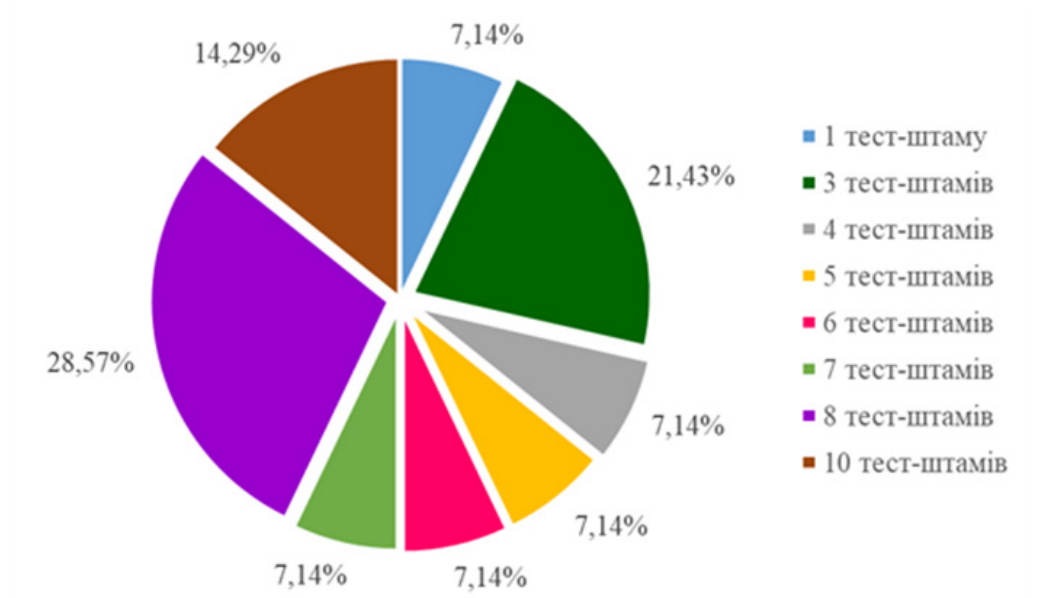


Рис. 2. Частка антагоністично активних штамів стрептоміцетів, виділених із мідій, після попереднього культивування на середовищі Гаузе 2

Fig. 2. Proportion of antagonistically active strains of streptomycetes isolated from mussels after pre-cultivation on Gauze 2 medium



суттєво впливає компонентний склад середовищ для попереднього культивування. За літературними даними антагоністична активність також залежить також від інших чинників, зокрема рН, температури і часу попередньої інкубації продуцентів та ін. [4, 26].

Важливе значення для реалізації антагоністичного потенціалу продуцентів (тобто комплексу їх антибіотичних речовин) має чутливість конкретного штаму індикатору.

Отримані дані щодо антагоністичної активності виділених із черепашнику стрептоміцетів демонструють, що грампозитивні бактерії, представлені штамми *M. luteus* ATCC 4698, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *K. rhizophila* DSM 348 (за виключенням *B. subtilis* ATCC 6633) набагато чутливіші, у порівнянні із бактеріями родини *Enterobacteriaceae* (рис. 3). Серед бактерій кишкової групи лише *K. pneumoniae* ATCC 10031 пригнічувалася метаболітами приблизно 30,0% штамів стрептоміцетів за їх попереднього культивування на середовищах Гаузе 1 і вівсяний агар з морською сіллю. Більше половини виділених із черепашнику штамів стрептоміцетів (за попереднього культивування на середовищах Гаузе 2 і Гаузе 1) пригнічували ріст *P. aeruginosa* ATCC 27853. Два штами, *Streptomyces* sp. Lim 4 і *Streptomyces* sp. Lim 3.2, проявили антагоністичну активність щодо *C. albicans* ATCC 18804, причому *Streptomyces* sp. Lim 4 за попереднього культивування і на середовищі Гаузе 2, і на середовищі Гаузе 1 (табл. 1, рис. 3).

Індикаторні мікроорганізми були більш чутливими до антагоністично активних штамів стрептоміцетів, виділених із мідій. Так само як і до стрептоміцетів із черепашнику чутливішими були грампозитивні бактерії (рис. 4). Але при цьому і розміри зон відсутності росту індикаторів, і кількість штамів стрептоміцетів-антагоністів були більшими (табл. 2, рис. 4). Чутливими до різної кількості стрептоміцетів також були представники родин *Enterobacteriaceae* і *Pseudomonadaceae*, а також дріжджоподібний мікроорганізм *C. albicans* ATCC 18804. Зауважимо, що кращу активність у більшості випадків стрептоміцети із мідій демонстрували після попереднього культивування на середовищі Гаузе 2.

Заслуговує уваги, що більшість штамів стрептоміцетів із мідій (78,6%) проявили антагонізм щодо індикаторного штаму *S. aureus* ATCC 25923 (рис. 4). Зокрема мова йде про штами *Streptomyces* spp. Myt 7b, Myt 7ch, Myt 5, Myt 2, Myt 3a, 12a, 4b, Myt 11, Myt 1, Myt 10, Myt 12b.

Найбільше ріст стафілококу пригнічували штами *Streptomyces* spp. Myt 12a і Myt 12b після попереднього культивування на середовищі Гаузе 2 (розміри зон відсутності росту були $29,4 \pm 0,1$ мм і $28,3 \pm 0,3$ мм, відповідно) (табл. 2). Отримані результати є обнадійливими, оскільки останнім часом з'являється все більше інформації про розповсюдження мультирезистентних штамів золотистого стафілококу, які або самі є причиною виникнення більше 100 форм інфекцій, у тому числі нозокоміальних, або викликають ускладнення основного захворювання [21].

Заслуговують на увагу штами *Streptomyces* spp. Myt 8 b, Myt 7b, Myt 7ch, Myt 5, Myt 4b, які так само як і штами *Streptomyces* spp. Lim 4 і Lim 3.2 пригнічують ріст *C. albicans*, що відзначається стійкістю до антибіотичних препаратів.



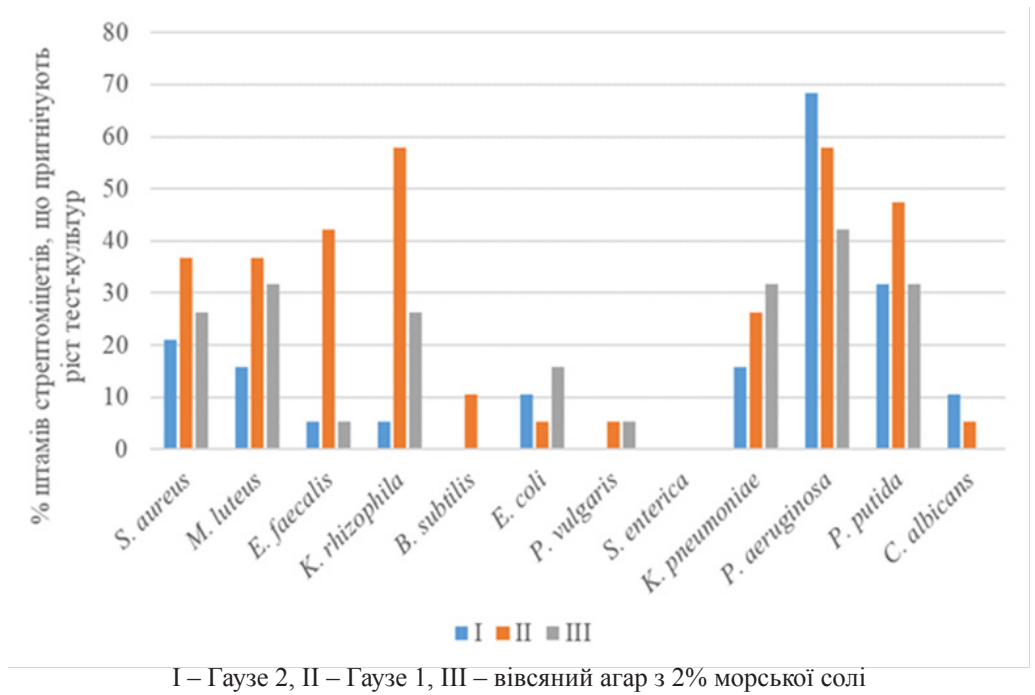


Рис. 3. Антагоністична активність штамів стрептоміцетів, виділених із черепашнику

Fig. 3. Antagonistic activity of streptomycetes' strains isolated from shell rock

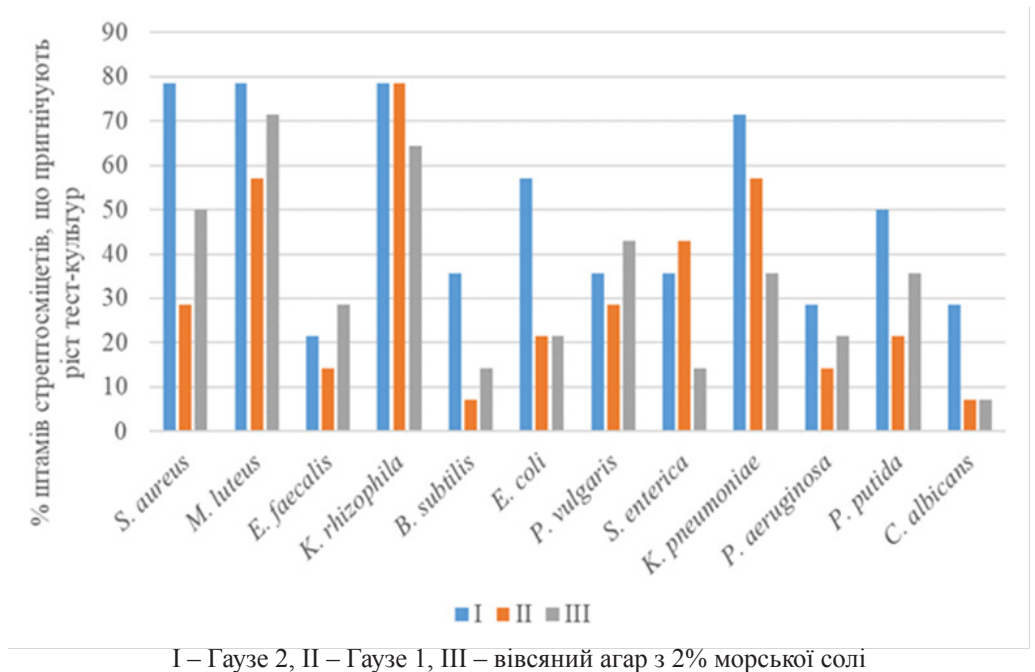


Рис. 4. Антагоністична активність штамів стрептоміцетів, виділених із мідій

Fig. 4. Antagonistic activity of streptomycetes' strains isolated from mussels



Таким чином, оцінюючи антагоністичний потенціал стрептоміцетів, виділених із різних джерел Одеської затоки Чорного моря, для подальших досліджень (зокрема, для проведення екстракції і вивчення хімічної структури антимікробних метаболітів) можемо рекомендувати штами *Streptomyces* spp. Lim 2.2, Lim 4, Lim 5.1 і Lim 7.2, виділені із обростань черепашнику, і штами *Streptomyces* spp. Myt 7b, Myt 7ch, Myt 12a і Myt 12b, виділені із мідій, які пригнічують ріст більшості індикаторних мікроорганізмів.

**I.V. Strashnova, K.S. Potapenko, N.V. Korotaeva,
G.V. Lisyutin, I.P. Metelitsyna**

Odesa I.I. Mechnikov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: fabiyanska@ukr.net

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF THE BLACK SEA STREPTOMYCETES ISOLATED FROM THE FOULING OF SHELL ROCK AND MUSSELS

Summary

*The rapid emergence of resistance by bacterial and fungal pathogens is a serious problem in the health care system, which causes the search for new promising producers of antimicrobial natural products in various ecological niches. **Aim.** To determine the antagonistic activity of streptomycetes isolated from the biological fouling of natural shell rock and mussels of the Odesa gulf of the Black Sea. **Methods.** The antagonistic activity of 19 and 14 strains of streptomycetes isolated from the fouling of shell rock and mussels of the Odesa gulf, respectively, were investigated. Streptomycetes were pre-cultivated on agar media Gause 1, Gause 2 and oat agar with sea salt (2%) at a temperature of 30 °C for 10 days. Antagonistic activity against 12 test cultures was determined by the block method. **Results.** All isolated marine streptomycetes are antagonists of at least one strain of the indicator microorganism. Antibiotic activity depended on the source of the streptomycetes isolation, culture medium and properties of specific strains of both producers and test cultures. The best activity of streptomycetes strains from shell rock was shown after cultivation on Gause 1 medium, and streptomycetes from mussels – after cultivation on Gause 2 medium. The zones of no growth of sensitive indicators ranged from 12,4±0,3 mm to 20,6±0,2 mm (under the influence of streptomycetes from shell rock) and from 12,4±0,2 mm to 39,7±0,2 mm (under the influence of streptomycetes from mussels). Streptomyces sp. Lim 2.2 (strain from a shell rock) inhibited the growth of 8 test cultures, and strains from mussels Streptomyces sp. Myt 4b and Myt 7ch – 10 test cultures. Indicator strains of gram-positive bacteria were the most sensitive to all streptomycetes, in particular, strain Staphylococcus aureus ATCC 25923 was most inhibited by metabolites of Streptomyces spp. Myt 12a and Myt 12b. **Conclusions.** Antagonistic activity of streptomycetes isolated from the Black Sea depended on the source of isolation, pre-cultivation medium and properties of both producer strains and indicator microorganisms. The greatest activity of streptomycete strains from shell rock and mussels was shown after preliminary cultivation, respectively, on Gause 1 and Gause 2 media against gram-positive bacteria. The best antibiotic potential was found in strains of Streptomyces sp. Lim 2.2, Lim 4, Lim 5.1 and Lim 7.2, isolated*



from the fouling of shell rock, and strains of *Streptomyces* sp. Myt 7b, Myt 7ch, Myt 12a and Myt 12b isolated from mussels.

Key words: marine streptomycetes, antagonistic activity, indicator microorganisms

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Белявская Л.А., Ефименко Т.А., Ефременкова О.В., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. Идентификация и антагонистические свойства почвенного стрептомицета *Streptomyces* sp. 100 // Микробиол. журн. – 2016. – Т. 78, № 2. – С. 61–73.
2. Білявська Л.О. Актинобактерії роду *Streptomyces* і їхні метаболіти у біорегуляції рослин: дис. ... док. біол. наук : 03.00.07. Київ. – 2018. – 485 с.
3. Громико О. Антагоністичні властивості актиноміцетів прикореневої зони маслини європейської *Olea europaea* L. // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2012. – Вип. 59. – С. 209–215.
4. Дрезваль О.А., Єременко А.О., Черевач Н.В., Вінніков А.І. Антагоністична активність ґрунтових стрептомицетів по відношенню до фітопатогенних бактерій та грибів // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – № 1. – С. 73–84. doi: [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2017.1\(37\).96323](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2017.1(37).96323)
5. Коротаєва Н.В., Потапенко К.С., Страшнова І.В., Метеліцина І.П., Іваниця В.О. Спектри жирних кислот актинобактерій біологічних обростань Одеської затоки Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2021. – № 3 (53). – С. 60–70. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3\(53\).245369](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).245369)
6. Коротаєва Н.В., Страшнова І.В., Васильєва Н.Ю., Потапенко К.С., Метеліцина І.П., Філіпова Т.О., Іваниця В.О. Характеристика актинобактерій, ізольованих із *Mutilus galloprovincialis* Одеської затоки Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2021. – № 3 (53). – С. 84–98. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3\(53\).246392](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).246392)
7. Кравченко В.Г. Сучасні топічні антибактеріальні засоби в умовах антибіотикорезистентності мікробної флори // Українські медичні вісті. – 2021. – Т.13, № 2 (87). – С. 143–147. doi: [10.32471/umv.2709-6432.87.1406](https://doi.org/10.32471/umv.2709-6432.87.1406)
8. Потапенко К.С., Коротаєва Н.В., Іваниця В.О. Вторинні метаболіти морських актинобактерій з антибіотичною активністю // Мікробіологія і біотехнологія. – 2021. – № 3 (53). – С. 28–43. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3\(53\).245323](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).245323)
9. Страшнова І.В., Коротаєва Н.В., Потапенко К.С., Васильєва Н.Ю., Чабан М.М., Штеніков М.Д., Лісютін Г.В., Іваниця В.О. Актинобактерії обростання твердих субстратів Одеської затоки Чорного моря // Морський екологічний журнал. – 2021. – № 2. – С. 71–82. doi: <https://doi.org/10.47143/1684-1557/2021.2.07>
10. Aljelawi R.O., Kadhem M.F. Production, purification, and characterization of bioactive metabolites produced from rare actinobacteria *Pseudonocardia Alni* // Asian J. Pharm. Clin. Res. – 2016. – V. 9 (3). – P. 1–3.
11. Baltz R.H. Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? // J. Ind. Microbiol.



- and Biotechnol. – 2006. – V. 33 (7). – P. 507–513.
<https://doi.org/10.1007/s10295-005-0077-9>
12. Chevrette M.G., Carlson C.M., Ortega H.E., Thomas C., Ananiev G.E. et al. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes // Nature communications. – 2019. – V. 10. – P. 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08438-0>
 13. De La Hoz-Romo M.C., Díaz L., Villamil L. Marine actinobacteria a new source of antibacterial metabolites to treat acne vulgaris disease – A systematic literature review // Antibiotics. – 2022. – V. 11. – P. 1–37.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11070965>
 14. Dholakiya R.N., Kumar R., Mishra A., Mody K.H., Jha B. Antibacterial and antioxidant activities of novel *Actinobacteria* strain isolated from gulf of Khambhat, Gujarat // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – P. 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02420>
 15. Dundore-Arias J.P., Felice L., Dill-Mackay R., Kinkel L.L. Carbon amendments induce shifts in nutrient use, inhibitory, and resistance phenotypes among soilborne *Streptomyces* // Frontiers in Microbiology. – 2019. – V. 10. – P. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00498>
 16. Gao H., Liu M., Liu J., Dai H., Zhou X. et al. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology // Bioresource Technol. – 2019. – V. 100 (17). – P. 4012–4016. doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.013
 17. Gavriilidou A., Mackenzie T., Sánchez P., Tormo J., Ingham C. et al. Bioactivity screening and gene-trait matching across marine sponge-associated bacteria // Mar. Drugs. – 2021. – V. 19 (2). – P. 1–17.
<https://doi.org/10.3390/md19020075>
 18. Lewin G.R., Carlos C., Chevrette M.G., Horn H., McDonald B.R. et al. Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications // Annu. Rev. Microbiol. – 2016. – V. 70. – P. 235–254.
doi:10.1146/annurev-micro-102215-095748
 19. Marques D.A.V., Cunha M.N.C., Araujo J.M., Filho J.L., Converti A. et al. Optimization on clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 by response surface methodology // Braz. J. Microbiol. – 2011. – V. 42 (2). – P. 658–667. doi: 10.1590/S1517-838220110002000030
 20. Martin J.F. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story // J. Bacteriol. – 2004. – V. 186 (16). – P. 5197–5201.
doi: 10.1128/JB.186.16.5197-5201.2004
 21. Mukherjee R., Priyadarshini A., Pandey R.P., Raj V.S. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* / Insights into drug resistance in *Staphylococcus aureus*. – IntechOpen, 2021. – P. 1–14. doi: 10.5772/intechopen.96888
 22. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019 // J. Nat. Prod. – 2020. – V. 83. – P. 770–803. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285?ref=pdf>
 23. Razieh R. Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in *Streptomyces* // Asian J. of Pharm. and Heal. Sci. – 2013. – V.3 (3). – P. 810–815. www.ajphs.com.



24. Sabido E.M., Tenebro C.P., Suarez A.F.L., Ong S.D.C., Trono D.J.V.L. et al. Marine sediment-derived *Streptomyces* strain produces angucycline antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* Harboring SCCmec Type 1 Gene // J. Mar. Sci. Eng. – 2020. – V. 8 (10). – P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/jmse8100734>
25. Sanchez S., Chavez A., Forero A., Garcia-Hunte Y., Romero A. et al. Carbon source regulation of antibiotic production // J. Antibiot. – 2010. – V. 63 (8). – P. 442–459. doi: 10.1038/ja.2010.78
26. Singh L.S., Sharma H., Talukdar N.C. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India // BMC Microbiology. – 2014. – V. 14. – P. 1–13. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/278>.
27. Zhu C.H., Lu F.P., He Y.N., Han Z.L., Du L.X. Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*: effect of glucose, ammonium ion and inorganic phosphate // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V.73 (5). – P. 1031–1038. doi:10.1007/s00253-006-0572-6
28. Tan L., Li L., Ashbolt N., Wang X., Cui Y. et al. Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin // Sci. Total Environ. – 2018. – V. 621. – P. 1176–1184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.110>
29. Tata S., Yekkour A., Mokrane S., Chaabane Chaouch F., Bouras N. et al. Influence of culture media on antifungal activity produced by produced by *Streptomyces* sp. Pal 114 isolated from Ghardaïa date palm grove soils // Af. Rev. of Sci. – 2018. – V. 3 (2). – P. 22–29.
30. World Health Organization (WHO). Lack of New Antibiotics Threatens Global Efforts to Contain Drug-Resistant Infections. Available online: <https://www.who.int/news-room/detail/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections> (accessed on 29 April 2020).
31. World Health Organization (WHO). La Escasez Mundial de Antibióticos Innovadores Favorece La Aparición y Propagación de La Farmacorresistencia. Available online: <https://www.who.int/es/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance> (accessed on 28 January 2022).

REFERENCES

1. Biliavska LA, Efimenko TA, Efremenkova OV, Koziritska VYe, Iutynska GA. Identification and antagonistic properties of the soil streptomycete *Streptomyces* sp. 100. *Microbiol. zhurn.* 2016; 78(2): 61–73 (in Russian).
2. Bilyavs'ka L.O. Aktynobakteriyi rodu *Streptomyces* i yikhni metabolity u bioregulyaciyi roslyn: dis. ... doc. biol. nauk. Kyiv. 2018: 485 (in Ukrainian).
3. Gromyko O. Antagonistic properties of actinomycete from the ryzospere of *Olea europaea* L. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology.* 2012; 59: 209–215 (in Ukrainian).
4. Drehval OA, Yeremenko AO, Cherevach NV, Vinnikov AI. Antagoistic activity of soil streptomycetes against phytopathogenic bacteria and fungi.



- Microbiology and biotechnology. 2017; 1: 73–84 (in Ukrainian).
doi: [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2017.1\(37\).96323](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2017.1(37).96323)
5. Korotaeva NV, Potapenko KS, Strashnova IV, Metelitsyna IP, Ivanytsia VO. The composition of cellular fatty acids of actinobacteria from the surfaces of biological growth of the Odesa gulf of the Black Sea. *Microbiology and biotechnology*. 2021; 3(53): 60–70 (in Ukrainian).
doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3\(53\).245369](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).245369)
 6. Korotaeva NV, Strashnova IV, Vasylieva NYu, Potapenko KS, Metelitsyna IP, Filipova TO, Ivanytsia VO. Characteristics of actinobacteria from *Mytilus galloprovincialis* of Odesa gulf of the Black Sea. *Microbiology and biotechnology*. 2021; 3(53): 84–98 (in Ukrainian).
doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3\(53\).246392](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).246392)
 7. Kravchenko VH. Modern topic antibacterial agents in the conditions of antibiotic resistance of human microbial flora. *Ukrainski medychni visti*. 2021; 13; 2(87): 143–147 (in Ukrainian). doi: 10.32471/umv.2709-6432.87.1406
 8. Potapenko KS, Korotaeva NV, Ivanytsia VO. Secondary metabolites of marine actinobacteria with antibiotic activity. *Microbiology and biotechnology*. 2021; 3(53): 28–43 (in Ukrainian).
doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3\(53\).245323](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).245323)
 9. Strashnova IV, Korotaeva NV, Potapenko KS, Vasylieva NYu, Chaban MM, Shtenikov MD, Lisyutin GV, Ivanytsia VO. Actinobacteria of growth of solid substrates of the Odesa gulf of the Black Sea. *Marine ecological journal*. 2021; 2: 71–82 (in Ukrainian). doi: <https://doi.org/10.47143/1684-1557/2021.2.07>
 10. Aljelawi RO, Kadhem MF. Production, purification, and characterization of bioactive metabolites produced from rare actinobacteria *Pseudonocardia Alni*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2016; 9(3): 1–3.
 11. Baltz RH. Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *J. Ind. Microbiol. and Biotechnol.* 2006; 33(7): 507–513.
<https://doi.org/10.1007/s10295-005-0077-9>
 12. Chevrette MG, Carlson CM, Ortega HE, Thomas C, Ananiev GE et al. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nature communications*. 2019; 10: 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08438-0>
 13. De La Hoz-Romo MC, Díaz L, Villamil L. Marine actinobacteria a new source of antibacterial metabolites to treat acne vulgaris disease – A systematic literature review. *Antibiotics*. 2022; 11: 1–37.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11070965>
 14. Dholakiya RN, Kumar R, Mishra A, Mody KH, Jha B. Antibacterial and antioxidant activities of novel *Actinobacteria* strain isolated from gulf of Khamhat, Gujarat. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02420>
 15. Dundore-Arias JP, Felice L, Dill-Macky R, Kinkel LL. Carbon amendments induce shifts in nutrient use, inhibitory, and resistance phenotypes among soilborne *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10: 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00498>



16. Gao H, Liu M, Liu J, Dai H, Zhou X et al. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresource Technol.* 2019; 100(17): 4012–4016. doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.013
17. Gavriilidou A, Mackenzie T, Sánchez P, Tormo J, Ingham C et al. Bioactivity screening and gene-trait matching across marine sponge-associated bacteria. *Mar. Drugs.* 2021; 19(2): 1–17. <https://doi.org/10.3390/md19020075>
18. Lewin GR, Carlos C, Chevrette MG, Horn H, McDonald BR et al. Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications. *Annu. Rev. Microbiol.* 2016; 70: 235–254. doi:10.1146/annurev-micro-102215-095748
19. Marques DAV, Cunha MNC, Araujo JM, Filho JL, Converti A et al. Optimization on clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 by response surface methodology. *Braz. J. Microbiol.* 2011; 42(2): 658–667. doi: 10.1590/S1517-838220110002000030
20. Martin JF. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J. Bacteriol.* 2004; 186(16): 5197–5201. doi: 10.1128/JB.186.16.5197-5201.2004
21. Mukherjee R, Priyadarshini A, Pandey RP, Raj VS. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Insights into drug resistance in Staphylococcus aureus*. IntechOpen, 2021: 1–14. doi: 10.5772/intechopen.96888
22. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 2020; 83: 770–803. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285?ref=pdf>
23. Razieh R. Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in *Streptomyces*. *Asian J. of Pharm. and Heal. Sci.* 2013; 3(3): 810–815. www.ajphs.com.
24. Sabido EM, Tenebro CP, Suarez AFL, Ong SDC, Trono DJVL et al. Marine sediment-derived *Streptomyces* strain produces angucycline antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* Harboring SCCmec Type 1 Gene. *J. Mar. Sci. Eng.* 2020; 8(10): 1–19. <https://doi.org/10.3390/jmse8100734>
25. Sanchez S, Chavez A, Forero A, Garcia-Hunte Y, Romero A et al. Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiot.* 2010; 63(8): 442–459. doi: 10.1038/ja.2010.78
26. Singh LS, Sharma H, Talukdar NC. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. *BMC Microbiology.* 2014; 14: 1–13. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/278>.
27. Zhu CH, Lu FP, He YN, Han ZL, Du LX. Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*: effect of glucose, ammonium ion and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 73(5): 1031–1038. doi:10.1007/s00253-006-0572-6
28. Tan L, Li L, Ashbolt N, Wang X, Cui Y et al. Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. *Sci. Total Environ.* 2018; 621: 1176–1184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.110>



29. Tata S, Yekkour A, Mokrane S, Chaabane Chaouch F, Bouras N et al. Influence of culture media on antifungal activity produced by produced by *Streptomyces* sp. Pal 114 isolated from Ghardaïa date palm grove soils. *Af. Rev. of Sci.* 2018; 3(2): 22–29.
30. World Health Organization (WHO). Lack of New Antibiotics Threatens Global Efforts to Contain Drug-Resistant Infections. Available online: <https://www.who.int/news-room/detail/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections> (accessed on 29 April 2020).
31. World Health Organization (WHO). La Escasez Mundial de Antibióticos Innovadores Favorece La Aparición y Propagación de La Farmacorresistencia. Available online: <https://www.who.int/es/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance> (accessed on 28 January 2022).

Стаття надійшла до редакції 02.12.2022 р.



УДК 634.8:579.64

Н.І. Теслюк, М.Л. Литвин, Т.В. Гудзенко

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

ОПТИМІЗАЦІЯ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПЕРВИННИХ ЕТАПІВ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ *IN VITRO* ВОЛОСЬКОГО ГОРІХУ

Мета роботи: оптимізація процесів мікроклонального розмноження волоського горіху (*Juglans regia*) *in vitro* шляхом добору складу та консистенції живильного середовища. **Матеріали і методи.** У роботі використовували методи введення ініціальних експлантів в культуру *in vitro* і мікроклонального розмноження. Застосовували ініціальні експланти – частини стебла і бруньки молодих паростків волоського горіху, пророщені міні-тепличним методом з плодів *Juglans regia*. Для введення експлантів *Juglans regia* в культуру *in vitro* використовували живильні середовища Murashige&Skoog (MS) та Driver&Kuniyuki (DKW). Як желювальний агент використано агар (7 г/л – тверде середовище). До напіврідкого середовища додавали 3,5 г/л агару, рідке – без додавання агару. Всі дослідні варіанти середовищ модифікували додаванням фітогормону цитокінінового ряду 6-БАП. Контроль рН середовища здійснювали на рівні 7,1–7,2. Культивували введені у культуру експланти при температурі +25 оС, інтенсивності освітлювання 2500 лк, відносній вологості 56–70% та фотоперіоді 16 годин – день, 8 годин – ніч. На 3-й, 7-й, 11-й день враховували показники приживлюваності, росту та розвитку ініціальних експлантів. **Результати.** Встановлено, що оптимальним живильним середовищем для введення у культуру та культивування волоського горіху в умовах *in vitro* є середовище DKW, на якому спостерігався високий відсоток приживлюваності експлантів (80%), а також прискорене набухання бруньок та їх проліферація. Запропоновано використовувати напіврідкі живильні середовища для введення ініціальних експлантів волоського горіху в культуру *in vitro*. Застосування напіврідкого живильного середовища DKW для первинних етапів введення волоського горіху в культуру *in vitro* сприяло прискоренню процесів мікроклонального розмноження цієї культури на 2 дні і покращенню приживлюваності на 20 % у порівнянні з твердим середовищем. **Висновок.** Рекомендовано застосування напіврідкого живильного середовища DKW для введення у культуру та культивування волоського горіху в умовах *in vitro* для збільшення показників приживлюваності експлантів на 20%, а також прискореній активації бруньок (2 дні) та їх подальшої проліферації.

Ключові слова: мікроклональне розмноження, волоський горіх, культура *in vitro*, експлант, живильне середовище



Однією з найцінніших культур рослин, що широко використовується у різних промислових напрямках, є волоський горіх (*Juglans regia*). Вчені відмічають: «плоди волоського горіха можуть рости лише на 7% господарських ґрунтів земної кулі, і українські ґрунти, як найкраще, підходять для вирощування цієї рослини» [2].

Горіхове дерево являє собою високоцінну рослину, деревина якої використовується у виготовленні меблів, а плоди у парфумерній, медичній та харчовій промисловості. Однак, при вирощуванні волоського горіха виробники стикаються з низкою проблем вегетативного розмноження. Так, наприклад, нерегулярний, низький рівень вкорінення, та високий рівень загибелі вкорієних рослин при акліматизації – основні причини зазначеної проблеми [8, 9]. Також серед актуальних проблем є проблема високої вартості саджанців. Ціна одного саджанця цієї рослини для вегетативного розмноження варіюється від 10 до 30 євро, не враховуючи елітні сорти [3].

Біотехнологія рослин – найперспективніша ланка аграрної промисловості, що дає змогу вирощувати рослинний матеріал вільний від захворювань, з покращеними ознаками, а також створювати нові цінні сортові культури [3]. Завдяки використанню методик мікроклонального розмноження рослин можна вирішити проблеми вегетативного розмноження волоського горіху і удосконалити технологію вирощування цієї рослини в культурі *in vitro* на території України. Тому, на думку вчених, «найбільш перспективним напрямком є розробка технології клонування *in vitro* волоського горіху» [1].

На сьогоднішній день для ефективного використання методик мікроклонального розмноження волоського горіха актуальним є пошук вирішення низки проблем та складнощів саме на етапах введення в культуру *in vitro*. Під час даного етапу необхідно враховувати багато чинників, у тому числі, правильність вибору донорної рослини та типу ініціального експланту, пори року для відбору, умов культивування, схеми поверхневої стерилізації рослинного матеріалу [10, 11, 13]. Так, наприклад, проблема побуріння середовища – одна з найсерйозніших проблем на етапі введення волоського горіха до культури *in vitro*. Фенолізацією є результат окиснення поліфенолів, що в більшості випадків виділяються з поверхні зрізу експлантів. Іноді, навіть за умови успішного етапу стерилізації ініціальні експланти все одно гинуть протягом перших днів культивування через виділення фенолоподібних речовин, подальше окиснення яких призводить до побуріння середовища та експланту і блокування транспорту поживних речовин у рослинних тканинах, перешкоджають росту клітин [7, 12]. Відомо, що побуріння середовища, фенолізації та подальшої загибелі експлантів можна уникнути завдяки корегуванню складу живильного середовища, частим субкультивуванням ініціальних експлантів волоського горіха на свіжі живильні середовища, обробкою антиоксидантами та інше [12, 14]. Добір та приготування живильного середовища є одним із найвідповідальніших етапів мікроклонального розмноження рослин.

Отже, кожний конкретний етап культивування експлантів та мікроклонів рослин у культурі *in vitro* потребує емпірично підібраних основних чинників



культивування для забезпечення ефективності розмноження [4].

Мета роботи – оптимізація процесів мікроклонального розмноження волоського горіху *in vitro* шляхом добору складу та консистенції живильного середовища.

Матеріали і методи

Як ініціальні експланти для введення в культури *in vitro* використовували частини стебла і бруньки молодих паростків рослини, пророщених міні-тепличним методом з плодів *Juglans regia* в умовах адаптаційного боксу (рис. 1).



Рис. 1. Молоді паростки *Juglans regia* отримані в умовах адаптаційного боксу

Fig. 1. Young sprouts of *Juglans regia* were obtained in the conditions of an adaptation box

Пророщування молодих паростків, відбір та стерилізацію рослинного матеріалу проводили згідно попередніх розробок [4]. Стерилізацію ініціальних експлантів проводили поетапно витримуванням та промиванням розчинами хінозолу (2г/л), гіпохлориту натрію (3%) та дистильованої стерильної води. Для введення експлантів *Juglans regia* в культуру *in vitro* було використано живильне середовище Murashige&Skoog (MS) та живильне середовище Driver&Kuniyuki (DKW) згідно прописів.

Солі макроелементів та мікроелементів застосовували за прописами: Murashige&Skoog (MS) [5] та Driver&Kuniyuki (DKW) [6].

Як желювальний агент використовували агар (7 г/л), до напіврідкого середовища додавали 3,5 г/л агару. Також, до складу живильних середовищ додавали 20 г/л цукрози.

Всі дослідні варіанти середовищ були модифіковані додаванням 6-БАП – фітогормону цитокінінового ряду. Контроль рН середовища здійснювали на рівні 7,1–7,2 перед початком автоклавування. Стерилізацію живильного середовища здійснювали в автоклаві під тиском 0,5 атмосфер протягом 20 хв.

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 год – день, 8 год – ніч.

Проводили спостереження за показниками приживлюваності, росту та розвитку ініціальних експлантів. На 3-й, 7-й, 11-й день після введення проводили відбраковування інфікованих експлантів, визначали терміни набухання та проліферації пазушних бруньок і враховували кількість життєздатних ініціальних експлантів.

Результати дослідження та їх обговорення

Оптимізація живильного середовища для первинних етапів культивування волоського горіха in vitro. Було проведено дослід по виявленню кращого живильного середовища для культури волоського горіха *in vitro* (табл.1). В результаті проведених досліджень встановлено, що кращим середовищем по всім дослідним показникам було середовище DKW.

Таблиця 1

Показники введення у культуру ініціальних експлантів *Juglans regia* на твердих середовищах DKW та MS (n= 30)

Table 1

Indicators of introduction into the culture of initial walnut explants on DKW and MS solid media (n= 30)

| Тип середовища | Приживлюваність експлантів, % | | | Набухання бруньок, шт | | | Проліферація, шт | | |
|----------------|-------------------------------|----|----|-----------------------|---|----|--------------------|---|----|
| | Доба культивування | | | Доба культивування | | | Доба культивування | | |
| | 3 | 7 | 11 | 3 | 7 | 11 | 3 | 7 | 11 |
| DKW тверде | 100 | 90 | 80 | 6 | 7 | 12 | 6 | 9 | 12 |
| MS тверде | 70 | 45 | 30 | 6 | 6 | 6 | 3 | 3 | 4 |

Показник приживлюваності ініціальних експлантів *Juglans regia* на середовищі DKW вище, ніж на середовищі MS в 2,7 рази (80 і 30% відповідно) станом на 11-у добу досліджень.

Із рис. 2 видно динаміку приживлюваності експлантів на впродовж 11 діб культивування (рис. 2). Виявлено, що до третьої доби культивування значної різниці між показниками приживлюваності не було, а ось надалі перевага середовища DKW була очевидною.

Візуальні спостереження за розвитком експлантів, культивованих на живильному середовищі DKW виявили менші ознаки виділення фенольних речовин у товщу середовища, некрозу та більші показники приживлюваності, ніж експланти, культивовані на середовищі MS.



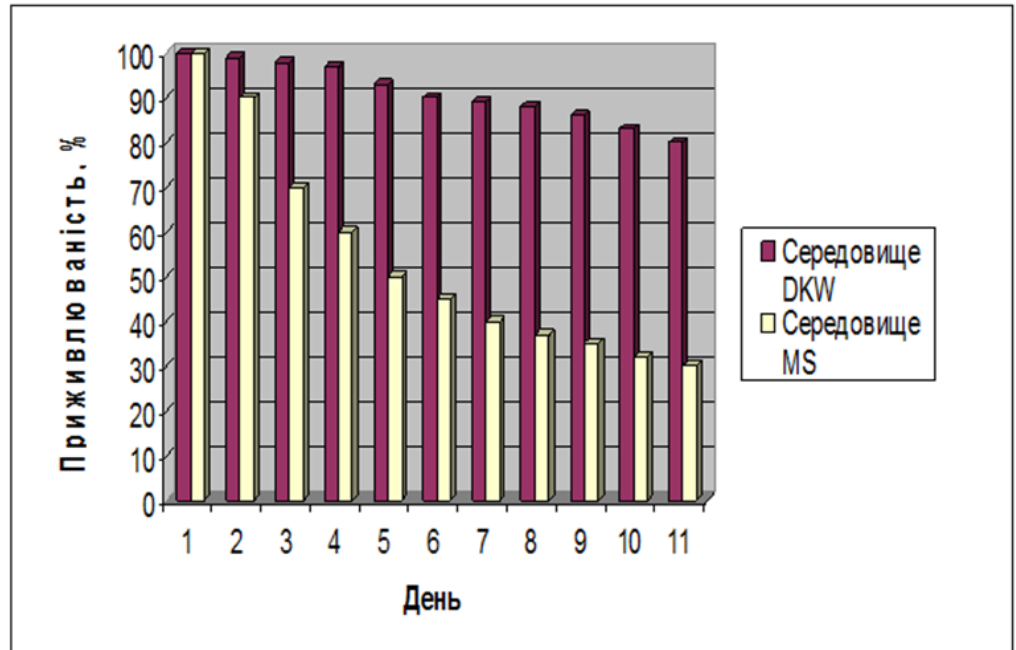


Рис. 2. Показники середньої приживлюваності ініціальних експлантів *Juglans regia* на різних видах живильних середовищ

Fig. 2. Indicators of average engraftment of initial explants of *Juglans regia* on different types of nutrient media

Починаючи з 3-ої доби культивування спостерігали набухання пазушної бруньки у експлантів (рис. 3). Надалі відбувалися процеси проліферації і розвитку пагону.



Рис. 3. Набухання пазушної бруньки *Juglans regia* на 3-й день культивування на середовищі DKW

Fig. 3. Swelling of the axillary bud of *Juglans regia* on the 3rd day of cultivation on DKW medium

Вже на 7-у добу культивування набухання пазухових бруньок було більш активним на середовищі DKW, ініціальні експлати візуально були зеленого кольору, без проявів побуріння як саме експлантів, так і живильного середовища. На 11-у добу від початку культивування вже чітко була помітною краща проліферація пазушних бруньок волоського горіху на середовищі DKW.

З аналізу даних експерименту можемо зробити висновок, що кращим живильним середовищем з обраних для первинних процесів введення культури волоського горіху є середовище DKW.

Наші результати співпадають із думкою К. Payghamzadeh та К. Kerpeneka, які вважають, що середовище DKW є найбільш оптимальним для вирощування *Juglans regia* в культурі *in vitro* [9, 10].

Вплив консистенції середовища на приживлюваність та розвиток експлантів *Juglans regia*. Зазвичай в культурі *in vitro* використовують тверді живильні середовища, виготовлені на основі агару, який являє собою складну суміш поліцукридів, що отримують при переробці червоних та бурих водоростей. Нами було проведено серію експериментів для встановлення впливу консистенції середовища на приживлюваність та розвиток експлантів *Juglans regia*. Запропоновано використовувати напіврідкі живильні середовища для введення ініціальних експлантів волоського горіху в культуру *in vitro*.

Результати досліджень, представлені у таблиці 3 виявили, що напіврідке середовище DKW є кращим для культури волоського горіху. Результати експериментів виявили високу життєздатність ініціальних експлантів горіху, низький відсоток фенолізації та високий відсоток набухання бруньок, а в подальшому проліферації та розвитку пагонів (табл. 2).

Таблиця 2

Порівняльна ефективність різних типів середовища DKW за даними приживлюваності, набухання бруньок та проліферації ініціальних експлантів *Juglans regia*

Table 2

Comparative effectiveness of different types of DKW medium according to survival, bud swelling and proliferation of initial explants *Juglans regia*

| Тип середовища | Кількість введених експлантів, шт | Приживлюваність експлантів, % | | Набухання бруньок, шт | | Проліферація, шт | |
|----------------|-----------------------------------|-------------------------------|----|-----------------------|----|--------------------|----|
| | | Доба культивування | | Доба культивування | | Доба культивування | |
| | | 7 | 11 | 7 | 11 | 7 | 11 |
| DKW тверде | 30 | 90 | 70 | 6 | 12 | 3 | 6 |
| DKW напіврідке | 30 | 95 | 90 | 9 | 16 | 6 | 12 |
| DKW рідке | 30 | 70 | 65 | 3 | 6 | 9 | 9 |

З представлених у таблиці 3 даних видно, що приживлюваність введених експлантів станом на 11-у добу на твердому середовищі DKW склала



70%, а на рідкому – 65%. На напіврідкому середовищі DKW приживлюваність рослинних експлантів склала 90%, що перевищувало відсоток приживлюваності на твердому та рідкому середовищах на 20% та 25%, відповідно (рис.4).

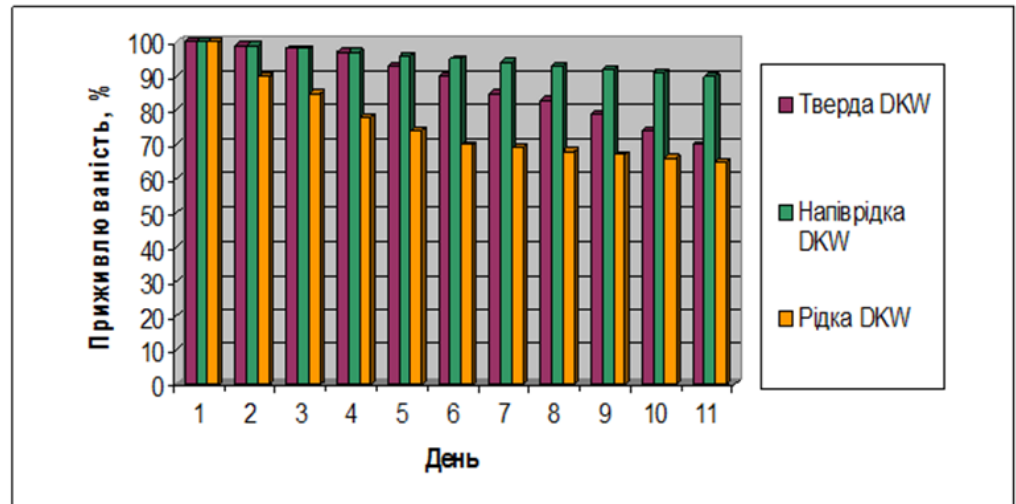


Рис. 4. Приживлюваність ініціальних експлантів *Juglans regia* на середовищі DKW з різними типами консистенції

Fig. 4. Viability of initial explants of *Juglans regia* on DKW medium with different types of consistency

Наступним параметром, за яким оцінювали вплив консистенції середовища була активація ростових процесів рослинних ініціальних експлантів. Приблизно на 3-ю добу після введення, у експлантів розпочиналося пробудження пазухових бруньок (набухання), з 7-ої доби розпочинався розвиток пагонів. Виявлено, що на напіврідкому середовищі набухання та подальша проліферація пазухової бруньки розпочиналася вже на 2-у добу від початку культивування, в той час як на твердому середовищі активація бруньок зафіксована на 3–4 добу культивування. При використанні рідкої консистенції середовища процеси початку проліферації бруньок волоського горіха гальмувалися, що можливо залежало від недостатньої аерації експлантів, занурених в рідину середовища.

Візуальні спостереження показали, що найефективніше процес формування пагонів відбувався на експлантах введених на середовище з напіврідкою консистенцією.

На напіврідкому середовищі експланти швидше формували пагони. Сформовані пагони мали насичений зелений колір та були пересаджені на середовище другого етапу культивування, а саме формування мікроклону та подальшої мультиплікації в культурі *in vitro*.

Оптимальним живильним середовищем для введення у культуру та культивування волоського горіху в умовах *in vitro* було напіврідке DKW, в якому спостерігався високий відсоток приживлюваності експлантів (80%), а також прискорене набухання бруньок та їх проліферація.

Використання напіврідкого живильного середовища DKW для первинних етапів введення волоського горіху в культуру *in vitro* сприяє прискоренню процесів мікроклонального розмноження цієї культури на 2 доби і покращенню приживлюваності на 20% у порівнянні з щільним середовищем.

Таким чином, для введення у культуру та культивування волоського горіху в умовах *in vitro* для збільшення показників приживлюваності експлантів, а також прискореній активації бруньок та їх подальшої проліферації рекомендовано застосування напіврідкого живильного середовища DKW.

N.I. Tesliuk, M.L. Lytvyn, T.V. Hudzenko

Odesa I.I. Mechnykov National University,
2, Dvoryanska St., Odesa, 65082. Ukraine, tel.: +38(048) 746 61 02,
e-mail: natalana@onu.edu.ua

OPTIMIZATION OF THE NUTRIENT MEDIUM FOR THE PRIMARY STAGES OF *JUGLANS REGIA* MICROCLONAL PROPAGATION IN VITRO

Summary

Aim. To optimize the processes of microclonal propagation of *Juglans regia* *in vitro* by selecting the composition and consistency of the nutrient medium. **Methods.** The methods of *in vitro* culture establishment of initial explants and microclonal propagation were used. Parts of the stem and buds of young sprouts, germinated by the mini-greenhouse method from the seeds of *Juglans regia*, were used as initial explants. Murashige&Skoog (MS) and Driver&Kuniyuki (DKW) nutrient media were used to establish *Juglans regia* explants *in vitro*. Agar was used as a gelling agent. The solid, semi-liquid, and liquid media were prepared with addition of 7 g/l, 3.5 g/l and 0 g/l of agar, respectively. All experimental variants of the media were modified by adding the phytohormone of the cytokinin group 6-BAP. The pH of the medium was controlled at the level of 7.1–7.2. The established explants *in vitro* were cultivated at a temperature of + 25°C, a light intensity of 2500 lux, a relative humidity of 56–70% and a photoperiod 16/8 h light/dark. On the 3rd, 7th and 14th day, the survival rate, growth and development parameters of the initial explants were estimated. **Results.** It was found that the optimal nutrient medium for *in vitro* establishment and cultivation of *Juglans regia* is the DKW medium, on which the high survival rate of explants was observed (80%), as well as accelerated swelling of buds and their proliferation. It is proposed to use semi-liquid nutrient media for *in vitro* establishment of initial *Juglans regia* explants. The use of semi-liquid nutrient medium DKW for the initial stages of common walnut micropropagation *in vitro* contributed to the acceleration of the processes of reproduction of this culture by 2 days and improved the survival rate by 20% compared to solid medium. **Conclusion.** The use of semi-liquid nutrient medium DKW for introduction into the culture and cultivation of walnut (*Juglans regia*) *in vitro* is recommended to increase the survival rate of explants by 20%, as well as the accelerated activation of buds (2 days) and their further proliferation.

Key words: microclonal propagation, *Juglans regia*, *in vitro* culture, explant, nutrient medium



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Зарнадзе Н. Ж., Ломтатидзе Н. Д., Зарнадзе Р. Ж. Варшанидзе Н.И., Джапаридзе З.Т. Микрклональное размножение грецкого ореха (*Juglans regia* L.) путем соматического эмбриогенеза // Вісн. Укр. Тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 60–64.
2. Затоковий Ф.Т., Сатіна Л.Ф., Сайко В.І. Основні підсумки досліджень генофонду горіха грецького на Буковині // Садівництво: міжвід. темат. наук. зб. – 2006. – № 58. – С. 46–51.
3. Теслюк Н. І., Литвин М. Л. Клональне мікророзмноження *Juglans regia* в культурі *in vitro* // Проблеми та перспективи реалізації та впровадження міждисциплінарних наукових досягнень. – 2021. – С. 66–69.
4. Теслюк Н. І., Литвин М. Л. Розробка підготовчого етапу мікрклонального розмноження *Juglans regia* в культурі *in vitro* // Біологічні процеси оптимізації продукційного процесу культурних рослин. – 2021. – С. 39–41.
5. Титаренко Т.С., Медведєва Т.В., Сатіна Г.М. Розмноження буковинських сортів горіха грецького (*Juglans regia* L.) // Садівництво. – 2009. – Вип. 62. – С. 22–29.
6. Driver J.A., Kuniyuki A.H. In vitro propagation of Paradox Walnutroot stock // Hort. Sci., 1984. – P. 19.
7. Ishtiaq A., Tanveer H., Irfan A., Nafees M., Rafay M., Iqbal M. Lethal Effects of Secondary Metabolites on Plant Tissue Culture // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. – 2013. – № 13(4). – P. 539–547.
8. Kaur R., Kumar K., Sharma D.R. In vitro germination of walnut (*Juglans regia* L.) embryos // Sci. Hortic, 2006. – P. 109.
9. Kepeneka K., Kolağasib Z. Micropropagation of Walnut (*Juglans regia* L.) // Specialissue of the 2nd International Conference on Computational and Experimental Science and Engineering (ICCESEN 2015). – 2016. – P. 130.
10. Nadra K, Maqsood A, Ishfaq H. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for in vitro shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes // J. Int. Sci. Vigne Vin. – 2015. – № 49. – P. 37–45.
11. Navatel JC, Bourrain L. Plant production of walnut *Juglans regia* L. by *in vitro* multiplication // Acta Hort. (ISHS). – 2001. – P. 465–471.
12. Payghamzadeh K, Kazemitabar SK. In vitro propagation of walnut // African Journal of Biotechnology. – 2011. – № 2. – P. 290–311.
13. Saadat YA, Hennerty MJ. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.) // Scientia Horticulturae. – 2002. – Vol. 95, № 3. – P. 251–260.
14. Taghizadeh M, Ganji Dastjerdi, Mahboubeh. Inhibition of browning problem during the callogenesis of *Spartium junceum* L. // Ornamental Horticulture. – 2021. – 27. 68–77. 10.1590/2447-536x.v27i1.2230.



REFERENCES

1. Zarnadze NZh, Lomtatydze ND, Zarnadze RZh, Varshanidze NI, Dzhaparidze ZT. Microclonal propagation of the *Juglans regia* L. through somatic embryogenesis. *Visn. Ukraine Society of Geneticists and Breeders*. 2008; 6 (1): 60–64 (in Russian).
2. Zatokovyi FT, Satina LF, Saiko VI. Osnovni pidsumky doslidzhen henofondu horikha hretskoho na Bukovyni. *Sadivnytstvo: mizhvid. temat. nauk*. 2006; 58: 46–51 (in Ukrainian).
3. Tesliuk NI, Lytvyn ML. Klonalne mikrorozmnozhennia *Juglans regia* v kulturi in vitro. *Problemy ta perspektyvy realizatsii ta vprovadzhen mizhdystsyplynarnykh naukovykh dosiahnen*. 2021; 66–69 (in Ukrainian).
4. Tesliuk NI, Lytvyn ML. Rozrobka pidhotovchoho etapu mikroklonalnoho rozmnozhennia *Juglans regia* v kulturi in vitro. *Biolohichni protsesy optymizatsii produktsiinoho protsesu kulturnykh roslyn*. 2021; 39–41 (in Ukrainian).
5. Titarenko TIe, Medvedieva TV, Satina HM. Rozmnozhennia bukovynskykh sortiv horikha hretskoho (*Juglans regia* L.) 2009; 6: 22–29 (in Ukrainian).
6. Driver JA, Kuniyuki AH. In vitro propagati on of Paradox Walnutroot stock. *Hort. Sci.*, 1984; 19.
7. Ishtiaq A, Tanveer H, Irfan A, Nafees M, Rafay M, Iqbal M. Lethal Effects of Secondary Metabolites on Plant Tissue Culture. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*. 2013; 13(4): 539–547.
8. Kaur R, Kumar K, Sharma DR. *In vitro* germination of walnut (*Juglans regia* L.) embryos. *Sci. Hortic*, 2006; 109 p.
9. Kepeneka K, Kolagasib Z. Micropropagati on of Walnut (*Juglans regia* L.) Specialissue of the 2nd International Conference on Computational and Experimental Science and Engineering (ICCESEN 2015). 2016; 130.
10. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for in vitro shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. *J. Int. Sci. Vigne Vin*. 2015; (49): 37–45.
11. Navatel JC, Bourrain L. Plant production of walnut *Juglans regia* L. by *in vitro* multiplication. *Acta Hort. (ISHS)*. 2001; 465–471.
12. Payghamzadeh K, Kazemitabar SK. In vitro propagation of walnut. *African Journal of Biotechnology*. 2011; (2): 290–311.
13. Saadat YA, Hennerty MJ. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Horticulturae*. 2002; 95 (3): 251–260.
14. Taghizadeh M, Ganji Dastjerdi, Mahboubeh. Inhibition of browning problem during the callogenesis of *Spartium junceum* L. *Ornamental Horticulture*. 2021; 27. 68–77. 10.1590/2447-536x.v27i1.2230

Стаття надійшла до редакції 07.10.2022 р.



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

Тематична спрямованість: мікробіологія, вірусологія, імунологія, молекулярна біотехнологія, створення та селекція нових штамів мікроорганізмів, мікробні препарати, антимікробні засоби, 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, англійська.

Рубрики журналу: «Оглядові 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 та українською/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).
- Молекулярну масу (Мм) – Да (дальтони) або кДа.
- При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.
- Активність ферментів виражають в мкмольх 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 ммольх/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 англомовні джерела)

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

Подгорский В. С. Систематическое положение, экологические аспекты и физиолого-биохимические особенности микроорганизмов, имеющих промышленное значение // *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 Е // 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 GdYVO₄:Eu³⁺ with cell nuclei. Dop Nats Akad Nauk Ukr. 2010;(10):81–86.

Книги:

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

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

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

Матеріали з'їздів, конференцій:

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



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 19.12.2022 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 3,30. Наклад 50 пр.
Зам. № 2512.

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