

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(58)  
2023

Одеса  
ОНУ  
2023

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. 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.uran.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Research Bib, Наукова електронна бібліотека e-LIBRARY, IBI Factor**

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) 731-71-51,  
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua  
<http://mbt.onu.edu.ua>

© Одеський національний університет  
імені І. І. Мечникова, 2023

Establisher  
by Odesa National Mechnikov 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, Georgia), 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 Mechnikov 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**

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

**A d d r e s s:**

Odesa National Mechnikov University,  
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine Tel.: +38 (048) 731-71-51,  
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua  
<http://mbt.onu.edu.ua>

© Odesa National Mechnikov  
University, 2023

## ЗМІСТ

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

<b>І.В. Страшнова, О.В. Андрющенко</b> АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ҐРУНТОВИХ БАЦИЛІ ЩОДО ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ УРАЖЕНИХ ЗЛАКОВИХ РОСЛИН .....	6
<b>Н.І. Теслюк, О.Ю. Зінченко, М.Б. Галкін, Т.О. Філіпова</b> УДОСКОНАЛЕННЯ ПРОЦЕСІВ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ <i>CHRYSANTHEMUM</i> × <i>KOREANUM HORT.</i> З ВИКОРИСТАННЯМ <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> ONU500 .....	17
<b>Б.М. Галкін, Т.В. Гладкій, Н.А. Кириленко</b> ВПЛИВ КОМБІНОВАНОЇ ФАРМАКОПРОФІЛАКТИКИ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ НА СТАН ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ .....	30
<b>Т.В. Гудзенко, І.В. Страшнова, О.Г. Горшкова, Г.В. Лісютін, М.Д. Штеніков, В.І. Сачковська</b> МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ ЧОРНОМОРСЬКОГО ШТАМУ <i>STREPTOMYCES</i> SP. LIM 10 .....	40
<b>В.В. Субота, А.М. Остапчук, М.Д. Штеніков</b> ПОГЛИБЛЕНА ГЕНОМНО-МЕТАБОЛОМНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ РОДУ <i>BACILLUS</i> , ВИДІЛЕНИХ З ГЛИБОКОВОДНИХ ВІДКЛАДЕНЬ ЧОРНОГО МОРЯ .....	51
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ .....	60

# CONTENTS

## EXPERIMENTAL WORKS

<b>I.V. Strashnova, O.V. Andriuschenko</b> ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOIL BACILLI AGAINST PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM AFFECTED CEREAL PLANTS .....	6
<b>N.I. Tesliuk, O.Y. Zinchenko, M.B. Galkin, T.O. Filipova</b> IMPROVEMENT OF THE <i>CHRYSANTHEMUM</i> × <i>KOREANUM</i> HORT. CLONAL MICROPROPAGATION PROCESSES USING <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> ONU500 .....	17
<b>B.M. Galkin, T.V. Hladkii, N.A. Kyrylenko</b> INFLUENCE OF COMBINED PHARMACOPROPHYLAXIS OF INFECTIOUS DISEASES ON THE CONDITION OF THE GASTROINTESTINAL TRACT OF LABORATORY RATS .....	30
<b>T.V. Gudzenko, I.V. Strashnova, O.G. Gorshkova, G.V. Lisiutin, M.D. Shtenikov, V.I. Sachkovska</b> MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF THE BLACK SEA STRAIN <i>STREPTOMYCES</i> SP. LIM 10 .....	40
<b>V.V. Subota, A.M. Ostapchuk, M.D. Shtenikov</b> DEEPENED GENOMICS-METABOLOMICS CHARACTERISTICS OF THE BACTERIA OF THE BACILLUS GENUS .....	51
ISOLATED FROM DEEP-SEA	
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS .....	60

**I.V. Strashnova, O.V. Andriuschenko**

Odesa I. I. Mechnikov National University,  
2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine,  
e-mail: fabiyanska@ukr.net, andriuschenko2016@gmail.com

### ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOIL BACILLI AGAINST PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM AFFECTED CEREAL PLANTS

***Aim** of this study was to investigate the antagonistic effect of bacilli isolated from the surface of plants and the rhizosphere zone of the soil against pathogens of barley and wheat diseases. **Materials and methods.** The material for the study was affected barley and wheat samples used to isolate phytopathogenic microorganisms, as well as samples of healthy plants and the rhizosphere soil zone used to isolate bacteria of the genus *Bacillus*. Manipulations for the isolation and investigation the biological properties of both phytopathogens and bacilli were carried out by traditional microbiological methods. The antagonistic activity of the isolated strains of bacilli against phytopathogens was studied by the block method. **Results.** From samples of affected wheat and barley were isolated microorganisms identified on the basis of the studied biological properties as *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Xanthomonas arboricola* and *Pectobacterium carotovorum*. The largest proportion of strains was represented by the micro-mycete *Fusarium oxysporum* – 53.9%. From samples of the rhizosphere soil zone and leaf-stem mass of healthy wheat and barley plants, 86 strains of bacteria of the genus *Bacillus* were isolated by microbiological methods. Antagonistic activity was inherent in 54 strains of bacilli against 25% of phytopathogens. All pathogenic microorganisms were inhibited with different intensity by 14 strains of bacilli. **Conclusion.** The most active bacillus strains (*Bacillus* spp. 6, 9, 13, 21, 50) were selected for further research.*

*Key words:* antimicrobial activity, soil bacilli, phytopathogenic microorganisms, affected cereal plants.

In modern conditions of grain production around the world, there is a tendency to expand the sowing of grain crops as the main source of production of the most important food for people, feed for farm animals and raw materials for industry. Wheat and barley are leading grain crops that are in great demand [1]. Ukraine exports more than 30 million tons of grain every year, ranking 4th in the world, and covers 15% of the world market.

One of the main factors destabilizing grain production is still the affected of plants by pathogens. At present, often due to changes in weather conditions, violation of crop cultivation technology and thoughtless use of chemicals, there is an increase in the development of phytopathogenic organisms, as well as the emer-



gence of new ones that previously had no economic value, often causing the death of agricultural crops [2].

The use of chemical fertilizers, plant protection agents and other pesticides has reached dangerous proportions and disrupts natural biological and physico-chemical processes. In this regard, microbiological preparations have an advantage and perspective. They increase the resistance of plants to abiotic and biotic stresses, do not cause the habituation of pests and are environmentally safe [3]. So, the development of biotechnologies for the protection of agricultural crops with the search for alternative ways of reducing the risk of the emergence and spread of pathogens of various etiologies, controlling phytophages and obtaining high-quality plant products is currently a priority and progressive trend [4]. One of the first steps in this direction is the search for and isolation of promising strains of microorganisms-antagonists of phytopathogens [5].

For this reason, the aim of this study was to investigate the antagonistic effect of bacilli isolated from the surface of plants and the rhizosphere zone of the soil against pathogens of barley and wheat diseases.

### Materials and methods

The material for the study was plant samples (wheat and barley) affected by phytopathogenic microorganisms, samples of healthy plants, as well as samples of the rhizosphere soil zone.

Samples of affected plants were used to isolate the microorganisms that caused the infections. From healthy plants, as well as soil samples, bacteria of the genus *Bacillus* were isolated.

Taking into account the peculiarities of phytopathogens, using the literature data, the isolation of phytopathogenic microorganisms was carried out on Sabouraud, Czapek-Dox and nutrient agar media [6].

Bacteria of the genus *Bacillus* were isolated from their rhizosphere zone of the soil and leaf-stem mass of healthy barley and wheat plants on nutrient agar and potato-glucose agar [6].

Manipulations for the isolation of both phytopathogens and bacilli were carried out by traditional microbiological methods [6].

The resulting pure cultures of microorganisms were studied by investigating a complex of biological properties: morphological, cultural, tinctorial, physiological and biochemical. The biochemical properties of all pure cultures were studied using API (BioMerieux) test systems corresponding to each taxon [7]. In particular, the biochemical properties of bacteria of the genus *Bacillus* were studied using the API 50 test system. The results were interpreted visually and deciphered using the APIWEB database [8]. Isolated strains of microorganisms were identified on the basis of the studied properties.

The antagonistic activity of the isolated strains of bacilli against phytopathogens was studied by the block method [9]. The results were taken into account after 24–48 hours when cultivated at 28 °C, measuring the size of the zones of the absence of growth of phytopathogens.



All studies were carried out in triplicate. Statistical processing of the results of the study was carried out using the MS Excel computer program with the definition of Student's t-criterion. The difference was statistically significant at  $p < 0.05$ .

### Results

When inoculating on Sabouraud, Czapek-Dox, nutrient agar, 100  $\mu\text{l}$  of suspensions prepared from affected samples of wheat and barley, in dilutions of  $10^{-2} - 10^{-3}$ , microorganisms were isolated that differ in the nature of growth on nutrient media. The isolation of pure cultures and the study of their properties: morphological, cultural, tinctorial, physiological and biochemical made it possible to carry out species identification. Most of the isolated cultures formed well-defined aerial and substrate mycelia on dense nutrient media, which made it possible to attribute these isolates to filamentous fungi. It is known that many infectious diseases of plants arise as a result of affected by micromycetes [10]. The results of our research confirm this. However, some of the strains grown on nutrient agar formed colonies whose morphology suggested the bacterial nature of the isolates.

The grown micromycetes differed in their morphological and cultural properties. Most of the solates differed in the rate of colony growth (dimensions varied from 4 to 8 cm), structure, and the presence of aerial mycelium (cotton, flaky, and loose). Color of colonies from white to purple (Fig. 1).



**Fig. 1. Colonies morphology of *Fusarium oxysporum* on Czapek-Dox medium**

As a rule, the colonies were white, with or without pink inclusions, the aerial mycelium was high, and the color of the reverse was white or pink. All isolates are fast-growing, homogeneous; there were dome-shaped and crater-shaped colonies. On nutrient media, the fungus forms colonies consisting of vegetative mycelium, macro- and microconidia, and chlamydospores. Branching conidiophores, with bottle-shaped phialides, pale yellow or light pink, formed on the mycelium, less often as a mucous layer in sporodochia or pionnots. Chlamydospores are abundant, intermediate or apical on hyphae, usually solitary, sometimes in chains, thick-walled, with a smooth or rough shell, colorless, one- or two-celled, 3.6–7.0 microns in diameter. Macroconidia are not numerous, usually with 3, very rarely with 4 or 5 septa, colorless, narrowly fusiform or ellipsoidal in shape, almost straight or slight-



ly sickle-shaped. The apical cells are short and slightly curved in some isolates. The basal cell had the appearance of a cut or in the form of a leg. Sizes of conidia with 3 septa are  $20\text{--}50 \times 2.5\text{--}5.5 \mu\text{m}$ , more often  $25\text{--}40 \times 3.5\text{--}5 \mu\text{m}$ , with 5 septa  $20\text{--}60 \times 3\text{--}5 \mu\text{m}$ , more often  $30\text{--}50 \times 3\text{--}4 \mu\text{m}$ . Microconidia are always abundant, formed on aerial mycelium on short monophialides, often in false heads, glued together with a mucous substance or in groups directly on hyphae, unicellular, sometimes 2- or 3-celled, ellipsoidal or kidney-shaped, colorless, sizes  $5\text{--}12 \times 2\text{--}4 \mu\text{m}$ . The studied morphological and cultural properties made it possible to attribute these isolates to the genus *Fusarium*.

Part of the fungal cultures at the beginning of their development formed a visually poorly expressed mycelium, cobwebbed. Subsequently, abundant dichotomous branching of the primary hyphae began and a well-defined layer of dense, white, long-lasting mycelium appeared. On Czapek-Dox it is white (Fig. 2), on nutrient agar it becomes yellowish-dark over time.

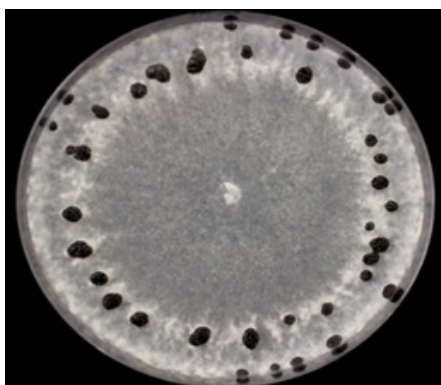
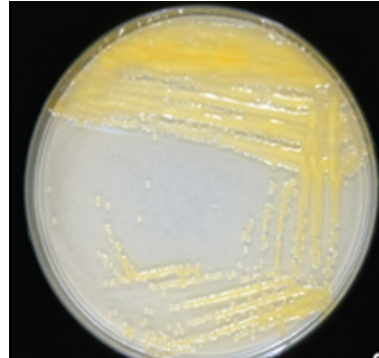


Fig. 2. Colonies morphology of *Sclerotinia sclerotiorum* on Czapek-Dox medium

When sclerotia matured, a putrefactive odor appeared, on Czapek-Dox it was weak, on nutrient agar it was strong, intensifying with the formation of sclerotia. After their full ripening, the smell weakened and was absent in the old culture. On solid media, the formation of sclerotia was registered by us when the mycelium reached the edge of the Petri dish, approximately for 4–5 days. At this time, an annular zone of white mycelium was formed along the edge of the colony 1.0–1.5 cm from the edge of the dish. Here it became thick, then flaky, and on it (at the very edge of the cup or not reaching it) mycelial clots began to appear, and then loose white tubercles – the beginnings of sclerotia. These tubercles gradually increased in size, taking on a more defined shape. The shell of the sclerotium was compacted and on the 10–14-th day from sowing the sclerotium mycelium was formed. Such morphological and cultural properties are typical for representatives of micromycetes of the genus *Sclerotinia*.

Bacteria isolates also differed in their properties. Some of them were straight sticks,  $0.5\text{--}0.8 \times 1.0\text{--}2.0 \mu\text{m}$  in size. They were motile by means of a polar flagellum. Gram-negative, spore-forming aerobic bacteria. On nutrient agar formed round, shiny, smooth colonies with a smooth edge. The studied colonies of these

isolates produced a yellow pigment – xanthomonas, which is a unique characteristic of the genus *Xanthomonas* (Fig. 3).



**Fig. 3. Colonies morphology of *Xanthomonas arboricola* on nutrient agar**

In addition, the colonies were slimy and oily, which is an essential feature that distinguishes pathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas* from saprophytes.

One strain of bacteria was short sticks, straight, with rounded edges, their size is approximately  $0.6\text{--}1.8 \times 1.7\text{--}5.1 \mu\text{m}$ . Single, connected in pairs or in short chains, movable. Flagellation is peritrichous. Bacteria did not form capsules or spores. Gram negative, facultative anaerobes. They were grown at a temperature of  $30^\circ\text{C}$ . On nutrient agar, the strain formed grayish-white, shiny, smooth colonies with smooth edges (Fig. 4).



**Fig. 4. Colonies morphology of *Pectobacterium carotovorum* on nutrient agar**

The studied biochemical properties made it possible to carry out species identification of the isolated strains and establish that 14 of them are representatives of the *Fusarium oxysporum*, 7 are *Sclerotinia sclerotiorum*, 4 are *Xanthomonas arboricola* and one is *Pectobacterium carotovorum* (Fig. 5).

When inoculating on nutrient and potato-glucose agar suspensions prepared from samples of healthy plants and the rhizosphere zone of the soil, morphologically similar colonies were visually determined after 24–48 hours: dense, wrinkled (less often uneven), shiny or matte, convex or flat (Fig. 6).

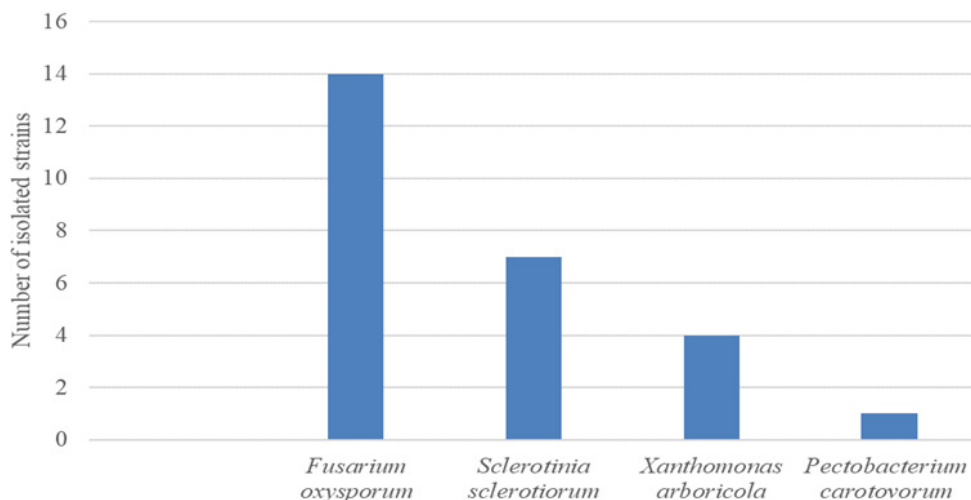


Fig. 5. Species diversity of strains isolated from affected plants

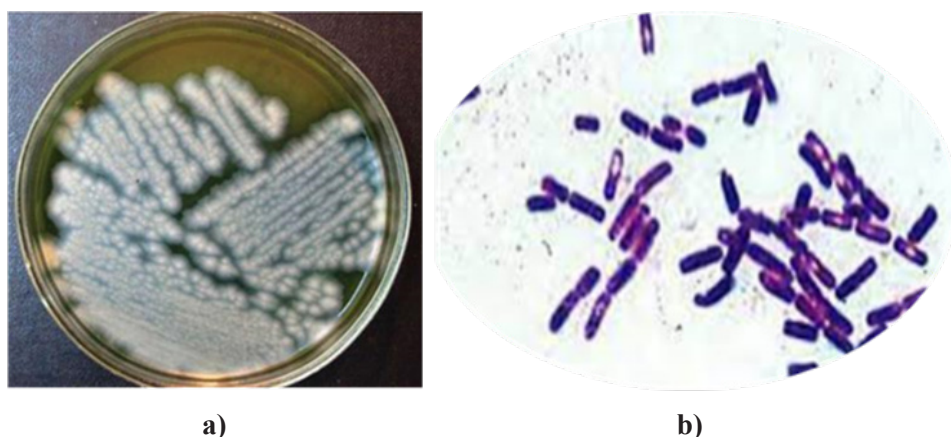


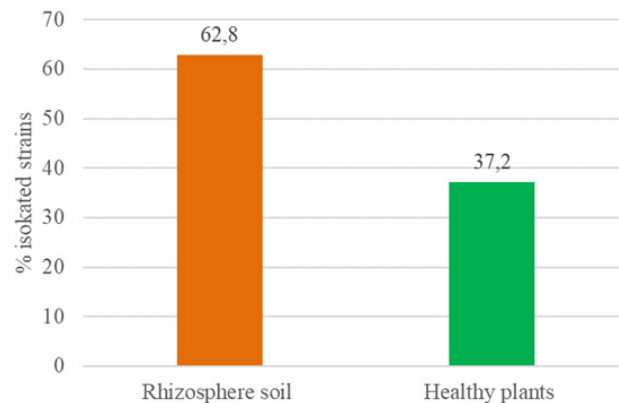
Fig. 6. Morphology of colonies (a) and cells (b) of the strain *Bacillus sp. 13*

Microscopy of Gram-stained preparations revealed gram-positive rods, the sizes of which ranged from 5 to 10 microns for different strains, were arranged in pairs, chains, on the second day of cultivation they formed spores, which were located in the cells mainly in the center, sometimes at the ends.

The study of biochemical properties showed that the isolated bacteria were somewhat variable, especially in the catabolism of such substrates as galactose, xylose and mannitol. The complex of results obtained during the study of biological properties made it possible to identify the isolated bacteria of the genus *Bacillus*. To carry out species identification, unfortunately, the identified properties are not enough and the use of molecular genetic methods is necessary.

Thus, 54 strains (which accounted for 62.8% of all isolates) and 32 strains (37.2%) of bacteria of the genus *Bacillus* were isolated from the rhizosphere soil zone and leaf-stem mass of healthy plants (barley and wheat), respectively (Fig. 7).



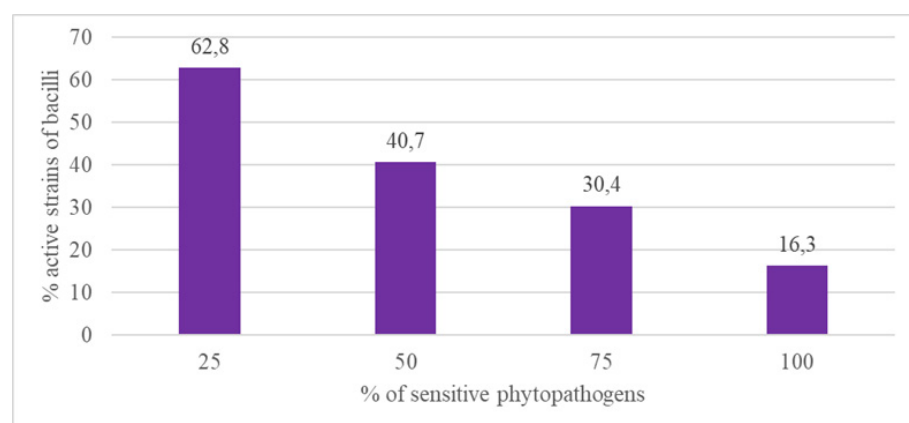


**Fig. 7. Proportion of isolated strains of bacteria of the genus *Bacillus* from different natural sources**

Microbial preparations based on bacilli are widely popular in various fields of medicine, veterinary medicine and agricultural production. Thanks to the synthesis of various metabolites, bacilli are able to suppress the development of many pathogenic microorganisms [11].

One of the first stages on the way to creating bacillary preparations is testing the ability of strains to show antagonistic activity against pathogens. Therefore, the next stage of the study was the investigation of the ability of isolated strains of bacteria of the genus *Bacillus* to prevent the growth of phytopathogenic microorganisms.

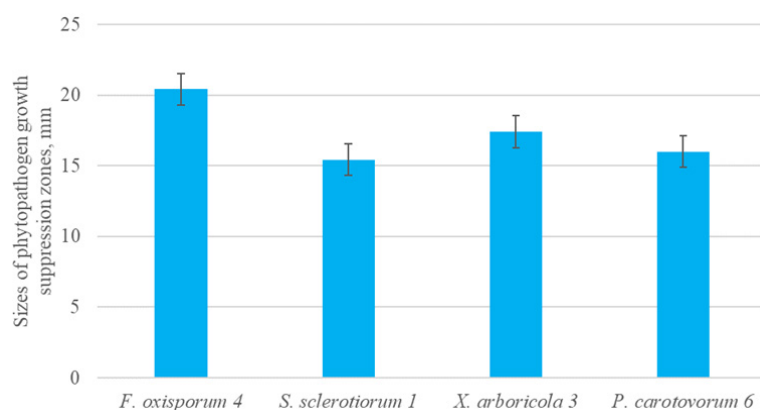
The results of the research showed that not all strains of bacilli inhibited the growth of phytopathogens isolated from the affected organs of wheat and barley. Of the 86 strains of bacilli isolated, the growth of a 25% of phytopathogens was inhibited by 54 strains (62.8%), the growth of half of phytopathogens was inhibited by 35 strains (40.7%), 75% of pathogens – 27 (31.4%) strains of bacilli (Fig. 8).



**Fig. 8. Proportion of isolated strains of bacilli that showed antagonism to various phytopathogens**

Note that these were phytopathogenic microorganisms of different structure. Among those studied, 14 strains of bacilli were found, which inhibited the growth of all phytopathogens with varying intensity, which was manifested in the size of the zones of absence growth.

The most active, that is, the metabolites of which significantly inhibited the growth of all isolated phytopathogenic microorganisms were strains of *Bacillus* spp. 6, 9, 13, 21, 50. Note that all these strains were isolated from samples of the rhizosphere soil zone. At the same time, the sizes of the absence zones of growth of phytopathogens were larger than 15 mm. In Fig. 9 is shown as an example, the antagonistic activity of *Bacillus* sp. 13 against certain strains of phytopathogenic microorganisms.



**Fig. 9. Antagonistic activity of *Bacillus* sp. 13 against phytopathogens**

As can be seen from the data shown in Fig. 9, the most sensitive to the action of *Bacillus* sp. 13 were *Fusarium oxysporum* 4 and *Xanthomonas arboricola* 3 (the sizes of the absence zones of growth were  $20.42 \pm 0.03$  mm and  $17.42 \pm 0.03$  mm, respectively).

When evaluating the data obtained, it should be noted that the manifestation of antagonistic activity depends on the specific strains taken in the experiment and on the conditions of the experiment.

Studies have shown that wheat and barley plants can be affected by phytopathogenic microorganisms of different structures. Microorganisms of fungal and bacterial nature were isolated from samples of affected plants. The frequency of their isolation was not the same with the dominance of representatives of filamentous fungi isolated in 80.8% of cases.

From the rhizosphere zone of the soil and leaf-stem mass of healthy barley and wheat were isolated, respectively, 62.8% and 37.2% of bacteria of the genus *Bacillus*, which is evidence of the widespread distribution of bacteria of this genus in nature, due to the peculiarities of the structure, metabolic activity and high adaptive capabilities.

Evaluating the antagonistic potential of bacilli against phytopathogens, we note that more than half of the isolated strains of bacilli inhibited the growth of

25% of strains of phytopathogenic microorganisms. The growth of all pathogens with different intensity was suppressed by 14 strains isolated exclusively from the soil. The most active strains (*Bacillus spp.* 6, 9, 13, 21, 50) were selected for further research on the creation of microbial preparations for agriculture.

**І.В. Страшнова, О.В. Андрищенко**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна  
e-mail: fabiyanska@ukr.net, andriuschenko2016@gmail.com

## **АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ҐРУНТОВИХ БАЦИЛ ЩОДО ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ УРАЖЕНИХ ЗЛАКОВИХ РОСЛИН**

### **Реферат**

**Метою** роботи було дослідження антагоністичної дії бацил, виділених з поверхні рослин та ризосферної зони ґрунту, проти збудників хвороб ячменю та пшениці. **Матеріали та методи.** Матеріалом для дослідження були зразки уражених ячменю та пшениці, з яких виділяли фітопатогенні мікроорганізми, а також зразки здорових рослин і ризосферної зони ґрунту, з яких виділяли бактерії роду *Bacillus*. Маніпуляції з виділення та дослідження біологічних властивостей як фітопатогенів, так і бацил проводили з використанням традиційних мікробіологічних методів. Антагоністичну активність виділених штамів бацил щодо фітопатогенів досліджували блоковим методом. **Результати.** Із зразків ураженої пшениці та ячменю виділено мікроорганізми, ідентифіковані на основі вивчених біологічних властивостей як *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Xanthomonas arboricola* та *Pectobacterium carotovorum*. Найбільшою часткою штамів був представлений мікроміцет *Fusarium oxysporum* – 53,9%. Із проб ризосферної зони ґрунту та листо-стебелової маси здорових рослин пшениці та ячменю мікробіологічними методами виділено 86 штамів бактерій роду *Bacillus*. Антагоністична активність притаманна 54 штамам бацил, які пригнічували ріст 25% фітопатогенів. Ріст усіх патогенних мікроорганізмів з різною інтенсивністю пригнічували 14 штамів бацил, виділених із ґрунту. **Висновок.** Для подальших досліджень відібрано найбільш активні штами бацил (*Bacillus spp.* 6, 9, 13, 21, 50).

*Ключові слова:* антимікробна дія, ґрунтові бацили, фітопатогенні мікроорганізми, уражені злакові рослини.

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Erenstein O., Jaleta M., Mottaleb K.A. et al. Global Trends in Wheat Production, Consumption and Trade/ Wheat Improvement Food Security in a Changing Climate / Ed.M.P. Reynolds, H.-J. Braun. – Springer Nature Switzerland AG, 2022. – P. 47–69.
2. Raza A., Razzaq A., Mehmood S.S. et al. Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review // Plants. –2019. – V. 8(2). – P. 34. <https://doi.org/10.3390/plants8020034>





3. *Akanmu A.O., Olowe O.M., Phiri A.T.* Bioresources in Organic Farming: Implications for Sustainable Agricultural Systems // *Horticulturae*. – 2023. – V. 9(6). – P. 659. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060659>
4. *Venbrux M., Crauwels S., Rediers H.* Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection // *Front. Plant Sci.* – 2023. – V. 14. – P. 1–25. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1120968>
5. *Pylak M., Oszust K., Frąc M.* Searching for New Beneficial Bacterial Isolates of Wild Raspberries for Biocontrol of Phytopathogens-Antagonistic Properties and Functional Characterization // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21(24). – P. 9361. <https://doi.org/10.3390/ijms21249361>
6. *Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С.* Практична мікробіологія: Посібник. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 440 с.
7. <https://apiweb.biomerieux.com>
8. <https://apiweb.biomerieux.com/login>
9. *Varner R.W., Krause R.L.* Agar-Block and Soil-Block Methods for Testing Wood Preservatives // *Ind. Eng. Chem.* – 1951. – V. 43(5). – P. 1102–1107.
10. *Anderson P.K., Cunningham A.A., Patel N.G. et al.* Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers // *Trends Ecol Evol.* – 2004. – V. 19(10). – P. 535–544. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.021>
11. *Tran C., Cock I.E., Chen X., Feng Y.* Antimicrobial *Bacillus*: Metabolites and Their Mode of Action // *Antibiotics (Basel)*. – 2022. – V. 11(1). – P. 88. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010088>

## REFERENCES

1. Erenstein O, Jaleta M, Mottaleb KA et al. Global Trends in Wheat Production, Consumption and Trade. Wheat Improvement Food Security in a Changing Climate. Ed.MP Reynolds, H-J Braun. Springer Nature Switzerland AG. 2022: 47–69.
2. Raza A, Razzaq A, Mehmood SS et al. Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. *Plants*. 2019; 8(2): 34. <https://doi.org/10.3390/plants8020034>
3. Akanmu AO, Olowe OM, Phiri AT. Bioresources in Organic Farming: Implications for Sustainable Agricultural Systems. *Horticulturae*. 2023; 9(6): 659. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060659>
4. Venbrux M, Crauwels S, Rediers H. Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection. *Front. Plant Sci.* 2023; 14: 1–25. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1120968>
5. Pylak M, Oszust K, Frąc M. Searching for New Beneficial Bacterial Isolates of Wild Raspberries for Biocontrol of Phytopathogens-Antagonistic Properties and Functional Characterization. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(24): 9361. <https://doi.org/10.3390/ijms21249361>
6. Klymniuk SI, Sytnyk IO, Tvorko MS. Praktychna mikrobiolohiia: Posibnyk. Ternopil. Ukrmedknyha. 2004: 440.
7. <https://apiweb.biomerieux.com>
8. <https://apiweb.biomerieux.com/login>



9. Varner RW, Krause RL. Agar-Block and Soil-Block Methods for Testing Wood Preservatives. *Ind. Eng. Chem.* 1951; 43(5): 1102–1107.
10. Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG et al. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers // *Trends Ecol Evol.* 2004; 19(10): 535–544. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.021>
11. Tran C, Cock IE, Chen X, Feng Y. Antimicrobial Bacillus: Metabolites and Their Mode of Action. *Antibiotics.* 2022; 11(1): 88. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010088>

Стаття надійшла до редакції 01.09.2023 р.





**Н.І. Теслюк, О.Ю. Зінченко, М.Б. Галкін, Т.О. Філіпова**

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

**УДОСКОНАЛЕННЯ ПРОЦЕСІВ  
МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ  
*CHRYSANTHEMUM* × *KOREANUM* HORT. З  
ВИКОРИСТАННЯМ *BACILLUS MEGATERIUM* ONU500**

*Метою роботи* було удосконалення процесів мікроклонального розмноження хризантеми в культурі *in vitro* з використанням бактерій штаму *B. megaterium* ONU500 під час постасептичної адаптації. *Матеріали і методи.* На первинних етапах мікроклонального розмноження було протестовано дві схеми поверхневої стерилізації експлантів хризантеми з використанням фунгіцидних препаратів. Визначали вплив концентрації агару у середовищі на розвиток та ріст експлантів. На етапі адаптації до умов *ex vitro* здійснювали інокуляцію коренів мікроклонів бактеріями штаму *B. megaterium* ONU500. *Результати.* Встановлено найбільш ефективну схему поверхневого знезараження рослинного матеріалу з використанням розчину фунгіциду Хінозол. Визначено, що використання живильного середовища Мурасіге та Скуга (МС) з 0,4% агару на етапі введення ініціальних експлантів хризантеми в культуру *in vitro* підвищувало приживлюваність на 9,3% та прискорювало проліферацію на 1 добу. Виявлено, що інокуляція ризосфери мікроклонів хризантеми позитивно впливала на ріст адаптованих мікросаджанців, підвищуючи їх приживлюваність у ґрунті на 20,4–22,2%, висоту надземної частини – на 1,8–1,9 см, середню кількість вузлів – на 2,0–2,2 вузли. *Висновок.* Було визначено дієвість використання фунгіцидів для обробки рослинного матеріалу хризантеми під час введення в культуру *in vitro*, та вплив консистенції живильного середовища на розвиток експлантів, що є новим та актуальним для підвищення ефективності мікроклонального розмноження цієї рослини. Також, вперше були здійснені експерименти з інокуляції мікроклонів хризантеми на етапі адаптації *ex vitro*, та показана позитивна дія такої інокуляції на морфометричні характеристики саджанців та їх приживлюваність. Надано рекомендації використовувати фунгіцид Хінозол для поверхневої стерилізації ініціальних експлантів хризантеми та проводити культивування на напіврідкому живильному середовищі МС із 0,4% агару. На етапі постасептичної адаптації мікроклонів доцільно проводити інокуляцію коренів бактеріями штаму *B. megaterium* ONU500 у концентраціях  $10^8$ – $10^9$  КУО/мл.

*Ключові слова:* мікроклональне розмноження, експлант, інокуляція, *Bacillus*, адаптація.



Розмноження декоративних рослин на сьогодні є однією з перспективних та прибукових галузей сільського господарства. Найбільшими виробниками квітково-декоративних культур на сьогодні є Нідерланди, Польща, США, Італія, Німеччина, Бельгія, Японія та Канада [13]. У світі постійно зростає попит на нові рослини для використання у внутрішньому і зовнішньому озелененні. Тому актуальною стає проблема масового розмноження однорічних і багаторічних декоративно-квіткових культур. Декоративні хризантеми є одними з перших по популярності вирощування квіткових культур на світовому ринку [15]. В даний час тільки в Японії налічується понад 15 000 сортів хризантем [11]. Традиційні способи розмноження хризантем не задовольняють потреби ринку. Біотехнологічні методи широко застосовуються при розмноженні хризантем в культурі *in vitro*, про що свідчать багаточисленні публікації [12, 16, 17]. Мікроклонування дозволяє налагодити процес цілорічного отримання великої кількості генетично однорідних, оздоровлених від інфекцій саджанців навіть за наявності невеликих потужностей виробництва, у той час як традиційне вегетативне чи статеве розмноження не мають даних переваг [15].

Хризантема корейська *Chrysanthemum* × *Koreanum* Hort. (надалі – хризантема) відноситься до групи багаторічних дрібноквіткових сортів хризантеми садової гібридного походження. Цей вид відрізняється стійкістю до низької температури повітря, через що широко культивується у відкритому ґрунті на території України [5].

Біотехнологічні методи клонального мікророзмноження хризантем активно розвиваються, але багато етапів цього процесу потребують суттєвих оптимізацій. Так, актуальною проблемою є скорочення термінів вирощування хризантем в культурі *in vitro* до стандарту продукції *ex vitro*. Важливим аспектом є також здешевлення виробництва садивного матеріалу без зміни його якості. Тому, для успішного використання методів мікроклонального розмноження хризантем у комерційній сфері питання підбору ефективних та недорогих речовин та живильних середовищ потребують суттєвої корекції та удосконалених підходів.

Дуже перспективним є використання мікробних препаратів як допоміжних засобів у біотехнології рослин. Особливо це стосується адаптації рослин до нестерильних умов середовища після мікроклонування, оскільки у цей період спостерігаються значні втрати садивного матеріалу.

Бацили є одними з найбільш широко вивчених рістстимулювальних бактерій для рослин, проте на ринку біопрепаратів постійно з'являються нові штами з іншими особливостями та вираженістю дії, тому дана тема залишається актуальною вже довгий час. Біопрепарати на основі бацил дозволяють знизити рівень використання пестицидів та хімічних добрив, оскільки являють собою їх екологічну та економічно вигіднішу заміну. Завдяки численним прямим та непрямим механізмам впливу на рослини, бактерії роду *Bacillus* стимулюють їх ріст, захищають від фітопатогенів та сприяють отриманню більших об'ємів врожаю високої якості [8, 10]. Можливо, штучна інокуляція корисними мікроорганізмами на етапі адаптації здатна покращити приживлюваність мікроклонів та зовнішні характеристики рослин, але даній темі присвячена обмежена кількість наукових публікацій.



**Метою** даного дослідження було удосконалення процесів мікроклонального розмноження хризантеми в культурі *in vitro* з використанням бактерій штаму *B. megaterium* ONU500 під час постсептичної адаптації.

### Матеріали та методи

Матеріалом для дослідження слугували молоді пагони та мікроклони хризантеми корейської *Chrysanthemum* × *Koreanum* Hort., а також бактерії штаму *B. megaterium* ONU500, який задепоновано у колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету [4, 6].

Донорні рослини хризантеми вирощувалися у відкритому ґрунті. Як ініціальні експланти використовували одновузлові відрізки пагонів рослин із пазуховими або верхівковими бруньками. Їх поміщали у скляну ємність для стерилізації та накривали двома-трьома шарами стерильної марлі. Перша експериментальна схема стерилізації включала такі етапи:

1. Промивання мильним розчином (10 хвилин);
2. Обробка розчином фунгіциду Хінозол 2 г/л (15 хвилин);
3. Експозиція у 3,5% розчині гіпохлориту натрію (8 хвилин);
4. Витримання у 70% етанолі (20 секунд) [3].

Друга схема стерилізації була наступною:

1. Промивання мильним розчином (10 хвилин);
2. Обробка розчином фунгіциду Хорус 1,4 г/л. (15 хвилин);
3. Експозиція у 3,5% розчині гіпохлориту натрію (8 хвилин)
4. Витримання у 70% етанолі (20 секунд) [3].

Експланти після стерилізації переносили у ламінар-бокс, де і проводили введення хризантеми в культуру *in vitro*. Для цього у одновузлових стерильних експлантів оновлювали зрізи і висаджували їх на середовищі Мурасіге та Скуга (МС) [14] із 1 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП).

У наступному експерименті, середовище МС для введення готували напіврідким (0,4% агару) або твердим (0,8% агару). На твердому середовищі експлант знаходився на поверхні, а на напіврідкому – перебував у напівзануреному стані.

Життєздатні експланти дорощували до формування 5–6 вузлів та живцювали з метою отримання великої кількості ідентичних мікроклонів. На другому етапі мікроклонального розмноження хризантеми як регулятор росту використовували 1,5 мг/л 6-БАП та 0,5 мг/л індолілоцтової кислоти.

Культивування мікроклонів хризантеми здійснювали у культуральному боксі при температурі 22–24°C, освітлення 1800–2000 лк, відносній вологості повітря 70%, та 16 год фотоперіоді.

Для вивчення процесів адаптації рослин до умов *ex vitro* було випробувано суспензії бактерій штаму *B. megaterium* ONU500 у концентраціях  $10^8$  та  $10^9$  КУО/мл. Суспензії отримували шляхом культивування бактерій протягом 24 год у рідкому середовищі LB (від англ. Lysogeny broth), після чого центрифугували при 3000 g, двічі відмивали у стерильному дистилаті та готували інокулят.



Для етапу адаптації відбирали мікроклони хризантеми з розвинутою кореневою системою та висотою пагону приблизно 3 см. Величина вибірки для однієї повторності експерименту становила 30 мікроклонів, на 10 шт. з яких тестували  $10^9$  КУО/мл бактерій, на інших 10 мікроклонах –  $10^8$  КУО/мл бактерій, а останні 10 рослин були контрольними.

Адаптацію починали із передадаційного етапу, коли мікроклонам поступово відкривали доступ до повітря протягом 7 діб, розширюючи отвори у кришках лабораторних ємностей із культивованими рослинами [3].

Після даного етапу мікроклони було розділено на три групи, у двох з яких ризосферу інокулювали бактеріями *B. megaterium* ONU500 у концентраціях  $10^8$  КУО/мл та  $10^9$  КУО/мл протягом 30 хвилин, а третя група експонувалася той самий час із стерильною дистильованою водою. Потім проводили висадку рослин у підготовлений субстрат – простерилізований гарячою паром під тиском 0,5 атм ґрунт «Універсальний» та агроперліт у співвідношенні 10:1.

Полив здійснювали 2 рази на тиждень стерильною дистильованою водою протягом перших 14 діб, а після – звичайною водопровідною водою.

За рослинами після висадки спостерігали протягом 30 діб. На 14-ту та 30-ту доби культивування вираховували приживлюваність – її оцінювали як відношення кількості життєздатних саджанців до усіх висаджених рослин. На 7-му, 14-ту та 30-ту добу вимірювали морфометричні показники росту та розвитку мікроклонів – висоту пагонів та кількість утворених вузлів.

Досліди здійснювали у трьох повторностях. Статистичне опрацювання даних проводили шляхом дисперсійного аналізу із застосуванням апостеріорного тесту найменшої значимої різниці (за наявності більше, ніж двох порівнюваних середніх). Значення, що достовірно відрізняються від контролю, у таблицях та рисунках позначені зірочкою «\*». У випадку, якщо значення показника достовірно відрізняються не тільки від контролю, а і між собою, то кількість знаків «\*» у позначеннях відрізняється. Розрахунки проводили за допомогою програм Microsoft Excel та IBM SPSS Statistics. Виявлена різниця між середніми значеннями вважалася достовірною при  $p < 0,05$ .

### Результати досліджень та їх обговорення

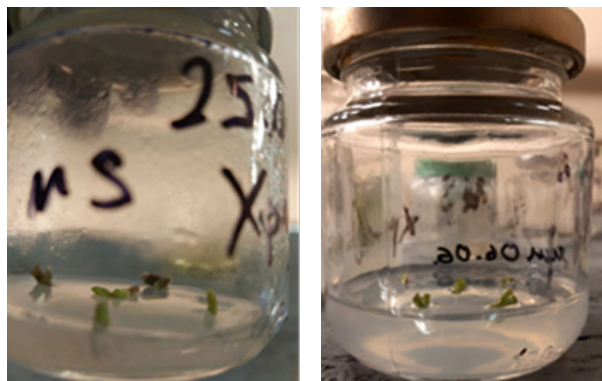
Успішне введення ініціальних експлантів хризантеми залежало від таких чинників, як ефективність поверхневої стерилізації рослинного матеріалу, дотримання асептичних умов роботи, а також від підбору оптимальної концентрації желювального компоненту у живильному середовищі (рис. 1).

Під час введення хризантеми в культуру *in vitro* було протестовано дві різні схеми стерилізації рослинного матеріалу з метою виявлення найбільш ефективної для даного виду рослин. Перша схема включала обробку розчином фунгіцидного препарату Хінозол. Друга схема містила обробку розчином фунгіциду Хорус.

Найвищі значення показника приживлюваності було відмічено за проведення стерилізації із використанням препарату Хінозол (табл. 1).

За однакових умов приживлюваність експлантів через два тижні культивування у схемі із використанням препарату Хорус була на 14,7% меншою



Рис. 1. Введення ініціальних експлантів хризантеми в культуру *in vitro*Fig. 1. *In vitro* culture establishment of chrysanthemum initial explants

Таблиця 1

Приживлюваність ініціальних експлантів хризантеми на середовищі МС за використання різних схем поверхневої стерилізації

Table 1

The survival rate of the *Chrysanthemum* × *Koreanum* initial explants on the MS medium under different surface sterilization conditions

Тип стерилізації	Приживлюваність, %		
	3 доби від початку культивування	7 днів від початку культивування	14 днів від початку культивування
Схема стерилізації I	65,4±3,2*	62,2±3,3*	60,4±3,7*
Схема стерилізації II (контроль)	55,5±3,6	52,1±4,1	45,7±4,8

Примітка – \*різниця з контролем є статистично достовірною при  $p < 0,05$

Note – \*the difference with the control is statistically significant at  $p < 0,05$

порівняно до схеми із розчином Хінозолу. Візуальні спостереження показали, що при використанні препарату Хінозол ініціальні експланти були зеленого кольору, без ознак некрозу.

Також, нами було встановлено, що для культивування експлантів хризантеми на первинних етапах ефективнішим було напіврідке середовище МС. У цьому випадку, експланти зависали у товщі середовища, що допомогало створювати більшу площу живлення – а це, у свою чергу, покращувало приживлюваність та проліферацію бруньок (табл. 2).

Використання напіврідкого середовища (0,4% агару) забезпечило підвищення приживлюваності на 9,3%, та прискорення проліферації пазухової бруньки на 1,0 доби. Завдяки даному удосконаленню вдалося зробити процес мікροклонального розмноження хризантеми більш економічно ефективним,



Таблиця 2

**Введення хризантеми в культуру *in vitro* на середовищах МС  
різної консистенції**

Table 2

***In vitro* culture establishment of *Chrysanthemum* × *Koreanum* on the MS  
medium of different consistency**

Концентрація агару	Приживлюваність, %	Проліферація бруньки, доба від початку культивування**
0,4% (напіврідке середовище)	65,0±3,7*	6,2±0,4*
0,8% (тверде середовище - контроль)	55,7±4,3	7,2±0,3

Примітка – \* різниця з контролем є статистично достовірною при  $p < 0,05$

\*\* кращими вважали менші значення показника

Note – \* the difference with the control is statistically significant at  $p < 0,05$

\*\* the smaller values were considered as better

оскільки краща приживлюваність забезпечувала в подальшому отримання більшої кількості садивного матеріалу, а прискорена проліферація пазухових бруньок дозволяла економити матеріальні та часові витрати під час вирощування мікроклонів у культуральній кімнаті за рахунок скорочення строків культивування. Запропоноване удосконалення є ресурсозберігаючим, що на сьогодні є особливо актуальним.

З метою оцінювання потенціалу використання бактерій штаму *B. megaterium* ONU500 для адаптації мікроклонів хризантеми, на 14-ту та 30-ту доби від моменту висадки вираховували приживлюваність.

На 14-ту добу приживлюваність мікроклонів під час адаптації до умов *ex vitro*, що були інокульовані  $10^9$  КУО/мл та  $10^8$  КУО/мл бактерій, була вищою на 12,4% та 11,1%, відповідно (табл. 3).

На 30-ту добу адаптації приживлюваність рослин, інокульованих  $10^9$  КУО/мл та  $10^8$  КУО/мл бактерій, відмічали на 20,4% та 22,2% більшою, ніж у контрольній групі мікроклонів. У контрольному варіанті часто спостерігали ознаки грибкового зараження мікросаджанців.

Також, протягом спостережень за процесом адаптації було встановлено, що інокуляція мікроклонів хризантеми бактеріями *B. megaterium* ONU500 позитивно впливала на морфометричні характеристики саджанців: висоту пагону та кількість вузлів.

На рис. 2 показано ріст мікроклонів хризантеми від першої до тридцятої доби адаптації.

Було встановлено, що обробка *B. megaterium* ONU500 в обох дослідних концентраціях показала позитивний, стимулювальний вплив на показники висоти пагону у порівнянні з контролем. Даний ефект суттєво збільшувався із часом: якщо на 14-ту добу адаптації інокульовані рослини були вищими за контрольні, в середньому, на 0,6 см, то на останню добу проведення дослідів



Таблиця 3

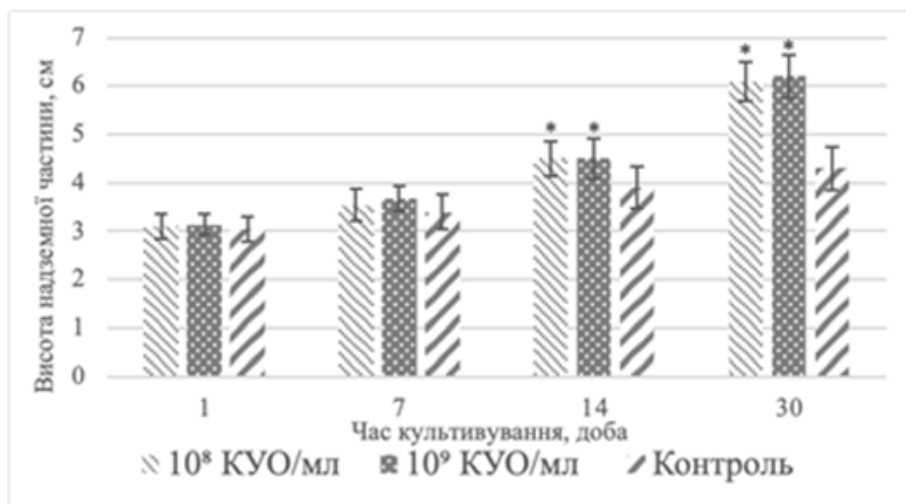
**Середня приживлюваність хризантеми при експозиції з *B. megaterium* ONU500**

Table 3

**The average survival rate of chrysanthemum after the exposition with *B. megaterium* ONU500**

Час культивування, доба	Концентрація суспензії бактерій, КУО/мл	Приживлюваність мікроклонів, %
14	10 <sup>9</sup>	85,7±2,6*
	10 <sup>8</sup>	83,4±3,3*
	Контроль	63,3±6,2
30	10 <sup>9</sup>	78,6±4,3*
	10 <sup>8</sup>	80,0±5,1*
	Контроль	58,2±8,3

Примітка – \*різниця з контролем є статистично достовірною при p<0,05  
 Note – \*the difference with the control is statistically significant at p<0,05



**Рис. 2. Висота надземної частини рослин хризантеми за інокуляції *B. megaterium* ONU500**

**Fig. 2. Shoot height of the chrysanthemum microclones after inoculation with *B. megaterium* ONU500**

різниця у висоті складала вже 1,8–1,9 см. Варто відзначити, що вплив обох дослідних концентрацій знаходився приблизно на одному рівні протягом усього періоду спостережень.

Значення показника кількості вузлів, як і ступінь прояву різниці між інокульованими та неінокульованими рослинами, поступово зростали із плином часу (рис. 3).

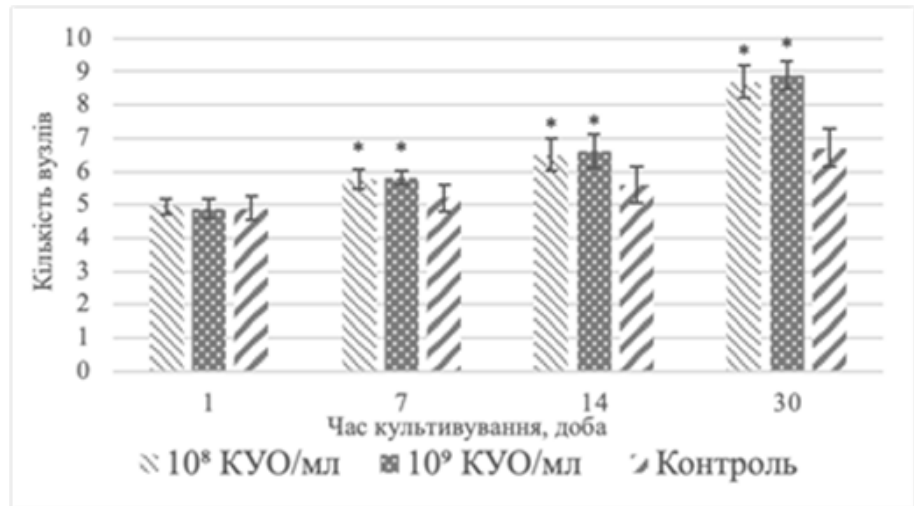


Рис. 3. Кількість вузлів у рослин хризантеми за інокуляції *B. megaterium* ONU500

Fig. 3. The average node number of the chrysanthemum microclones after inoculation with *B. megaterium* ONU500

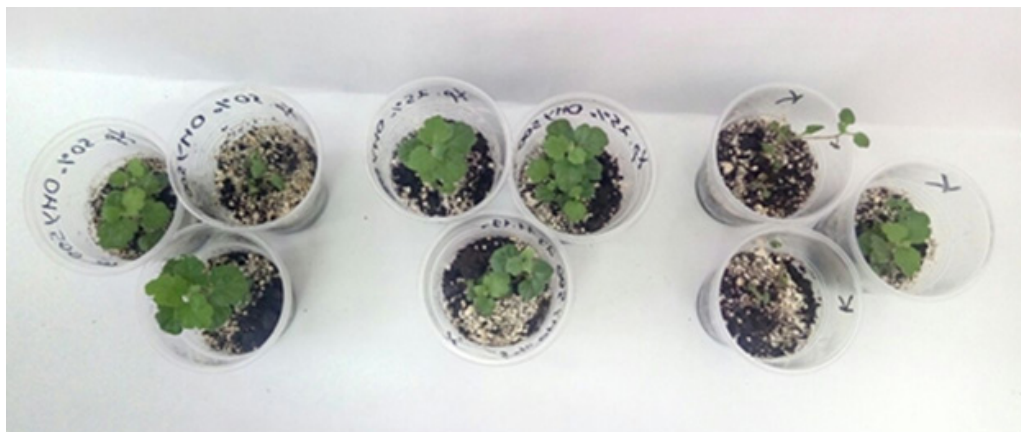
Інокуляція дослідними концентраціями *B. megaterium* ONU500 забезпечувала статистично однаковий ефект на формування вузлів мікроклонами хризантеми: на 7-му добу різниця із контролем складала 0,6 вузла, на 14-ту – 0,9–1,0 вузла, а на останню добу оброблені бактеріями рослини мали від 2,0 до 2,2 вузлів більше у порівнянні з неінокульованими.

Відповідно, за місяць постасептичної адаптації інокульовані рослини демонстрували більшу швидкість росту та розвитку, ніж контрольні (рис. 4).

Щільність інокуляції не показала суттєвого впливу на приживлюваність та морфометричні показники саджанців хризантеми – обидві концентрації  $10^8$  КУО/мл та  $10^9$  КУО/мл позитивно впливали на мікроклоновані рослини з однаковим ступенем інтенсивності. Можливо, що і менші концентрації інокуляту матимуть схожий ефект, але дане припущення буде предметом наступних досліджень.

Наявні результати підтвердили та доповнили вже відомі дані про ріст-стимулювальний потенціал бактерій штаму *B. megaterium* ONU500. У попередніх роботах було показано здатність цих мікроорганізмів до утворення біоплівки на корнях модельних рослин та стимулювання росту рослин томатів і соняшника [1, 7, 9]. Також, було показано їх можливість синтезувати сидерофори та встановлено антагоністичний потенціал проти деяких фітопатогенів,





**Рис. 4. Мікроклони хризантеми на 30-ту добу адаптації з *B. megaterium* ONU500:**

ліворуч – інокульовані  $10^9$  КУО/мл бактерій, посередині – інокульовані  $10^8$  КУО/мл бактерій, праворуч – неінокульований контроль

**Fig. 4. Chrysanthemum microclones on the 30th day of adaptation with *B. megaterium* ONU500:**

on the left – inoculated with  $10^9$  CFU/ml of bacteria, in the center – inoculated with  $10^8$  CFU/ml of bacteria, on the right – uninoculated control

що може бути важливим елементом підвищення приживлюваності мікроклонів у ґрунті під час адаптаційного стресу [2]. Проте, можуть існувати також і інші механізми взаємодії рослин із даними бактеріями, що потребує окремих поглиблених досліджень.

Встановлено, що стерилізація рослинного матеріалу хризантеми для введення у культуру *in vitro* з використанням розчину препарату Хінозол підвищувала приживлюваність експлантів на 14,7%. Культивування експлантів на напіврідкому середовищі МС з 1 мг/л 6-БАП забезпечувало підвищення приживлюваності на 9,3% та прискорення проліферації на 1,0 доби у порівнянні з твердим середовищем. Встановлено, що бактерії *B. megaterium* ONU500 у концентраціях  $10^8$  КУО/мл та  $10^9$  КУО/мл позитивно впливали на мікроклоновані рослини хризантеми під час адаптації до умов *ex vitro*, підвищуючи приживлюваність у ґрунті на 20,4–22,2%, середню висоту – на 1,8–1,9 см, кількість вузлів – на 2,0–2,2 вузли у порівнянні з контролем протягом місяця постасептичної адаптації.

Для наукових та комерційних біотехнологічних лабораторій та центрів рекомендовано під час введення рослинного матеріалу хризантеми в культуру *in vitro* рекомендовано використовувати розчини фунгіциду Хінозол для поверхневої стерилізації, та проводити культивування ініціальних експлантів на напіврідкому живильному середовищі із 0,4% агару. На етапі *ex vitro* адаптації рекомендовано проводити інокуляцію коренів мікроклонів бактеріями штаму *B. megaterium* ONU500 у концентраціях  $10^8$ – $10^9$  КУО/мл.

**N.I. Tesliuk, O.Y. Zinchenko, M.B. Galkin, T.O. Filipova**

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

## **IMPROVEMENT OF THE *CHRYSANTHEMUM* × *KOREANUM* HORT. CLONAL MICROPROPAGATION PROCESSES USING *BACILLUS MEGATERIUM* ONU500**

### **Summary**

The **aim** of this study was to improve the *Chrysanthemum* × *Koreanum* micropropagation processes using *Bacillus megaterium* ONU500 at the post-aseptic adaptation stage. **Methods.** At the initial stages of clonal micropropagation, two surface sterilization protocols with different fungicidal preparations were tested. The influence of the agar concentration in the medium on the development of explants was determined. At the ex vitro adaptation stage, the roots of the microclones were inoculated with bacteria of the strain *B. megaterium* ONU500. **Results.** The most effective protocol for plant material surface disinfection, which included quinozol and ethanol, was established. It was determined that the use of Murashige and Skoog (MS) nutrient medium supplemented with 0.4% agar at the stage of in vitro culture establishment increased the survival of chrysanthemum initial explants by 9.3% and accelerated proliferation by 1 day. It was found that inoculation of the chrysanthemum microclone rhizosphere with bacteria had a positive effect on the growth of adapted plantlets, increasing their survival rate by 20.4–22.2%, shoot height by 1.8–1.9 cm, and average number of nodes by 2.0–2.2 nodes. **Conclusion.** The effectiveness of the use of fungicides for the treatment of chrysanthemum plant material during in vitro culture establishment and the influence of the consistency of the nutrient medium on the development of explants were determined, which is new and relevant for increasing the efficiency of clonal micropropagation of this plant. Also, experiments on the inoculation of chrysanthemum microclones at the stage of ex vitro adaptation were carried out for the first time, and the positive effect of such inoculation on the morphometric characteristics of seedlings and their survival rate was shown. When establishing chrysanthemum explants in vitro, it is recommended to use the fungicide quinozol for surface sterilization, and carry out cultivation in a semi-liquid nutrient medium with 0.4% agar. At the postaseptic adaptation stage of microclones, it is advisable to inoculate the roots with bacteria of the strain *B. megaterium* ONU500 at concentrations of  $10^8$ – $10^9$  CFU/ml.

*Key words:* clonal micropropagation, explant, inoculation, *Bacillus*, adaptation.

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бабенко Д.О., Мрачковська Ю.О., Крилова К.Д. Дія бактерій штаму *Bacillus megaterium* ONU 500 на вегетуючі рослини *Lycopersicon esculentum* // Наук. конф. «Biotechnology for agriculture and environmental protection» (Одеса, вересень, 2016 р.): Тези доп. – ОНУ ім. І. І. Мечникова, 2016. – 244 с.
2. Защинська О.С. Мікробні сидерофори як можливі фактори антагонізму бактерій *Bacillus megaterium* щодо патогенних *Agrobacterium* spp. //



- Збірка матеріалів наукового товариства студентів, аспірантів і молодих вчених. – Одеса: Репозитарій наукової бібліотеки ОНУ імені І. І. Мечникова, 2019. – 39 с.
3. Зеленянська Н.Н., Джабурія Л.В., Теслюк Н.І. Технологія розмноження винограду з використанням методів культури тканин *in vitro* // Виноград. – 2009. – № 3. – С. 50–53.
  4. Іваниця В.О., Штеніков М.Д., Остапчук А.М., Горшкова О.Г., Теслюк Н.І., Титаренко Н.В., Гудзенко Т.В. Пат. 126710 України МПК А01N63/22. Штам *Bacillus velezensis* ONU553 – продуцент ліпопептидних антибіотиків, антагоніст *Staphylococcus aureus* та ентеробактерій з ростостимулювальною активністю. Київ: Національний орган інтелектуальної власності - державна організація “Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій”. – 2023.
  5. Конюшенко К.І. Екологічна оцінка перспектив використання роду *Chrysanthemum* L. в зеленому будівництві м. Житомир : кваліфікаційна робота : спец. 101 «Екологія» // Поліський нац. університет, каф. загальної екології, наук. керівник С. І. Матковська. – Житомир, 2020. – 44 с.
  6. Мікробіологічні дослідження Чорного моря: монографія / В.О. Іваниця, Т.В. Гудзенко, І.В. Страшнова, Н.Ю. Васильєва, М.Д. Штеніков, Н.В. Коротаєва, Лісютін Г.В., Горшкова О.Г., Волювач О.В., Потапенко К.С., Боброва О.Є., Іваниця Т.В., Філіпова Т.О., Чабан М.М.; ред. В.О. Іваниця – Одеса: ОНУ, 2021. – 282 с.
  7. Мрачковська Ю.О., Крилова К.Д., Галкін Б.М. Формування біоплівки пробіотичним штамом *Bacillus megaterium* ОНУ500 на коренях рослин *Lepidium sativum* L. // Міжн. наук. конф. «Біологія: від молекули до біосфери» (2–4 грудня 2015 р., м. Харків, Україна). – Х.: ФОП Шаповалова Т. М., 2015.
  8. Титаренко Н.В., Теслюк Н.І., Іваниця В.О. Перспективи використання бактерій у культурі клітин та тканин рослин // Мікробіологія та біотехнологія. – 2020. – № 3. – С. 6–31.
  9. Швець Ю.А., Крилова К.Д., Лиманська Н.В. Вплив *Bacillus megaterium* ОНУ 500 на проростання та ріст сіянь соняшника // Мікробіологія і біотехнологія. – 2021. – № 1(51). – С. 45–54.
  10. Agake S., Ohwaki Y., Kojima K., Yoshikawa E., Artigas Ramirez M.D., Bellingrath-Kimura S.D., Yamada T., Ookawa T., Ohkama-Ohtsu N., Yokoyama T. Biofertilizer with *Bacillus pumilus* TUAT1 Spores Improves Growth, Productivity, and Lodging Resistance in Forage Rice // Agronomy. – 2022. – № 12(10). – Art. 2325.
  11. Datta S.K. (2013). *Chrysanthemum morifolium* Ramat. – a unique genetic material for breeding // Sc. Culture. – 2013. – № 7(8). – P. 307-313.
  12. Deein W., Thepsithar C., Thongpukdee A. Growth of *Chrysanthemum* explants on MS medium sterilized by disinfectants and essential oils // Int. J. Biosci., Biochem. Bioinformatics. – 2013. – № 3(6). – P. 609–613.
  13. Getu M. Ethiopia floriculture and its impact on the environment. Regulation, Supervision and Compliance // Mizan Law Rev. – 2009. – № 3(2). – 242 p.



14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia plantarum*. – 1962. – № 15(3) – P. 473–497.
15. Teixeira da Silva J.A., Kulus D. *Chrysanthemum* biotechnology: discoveries from the recent literature // *Folia Horticulturae*. – 2014. – № 26(2) – P. 67–77.
16. Tymoszek A., Zalewska M. *In vitro* adventitious shoot regeneration from ligulate florets in the aspect of application in *Chrysanthemum* breeding // *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*. – 2014. – 13(2). – P. 45–58.
17. Zhou Y., Wang Y. Y., Song Y. R., Gao Z. Y., Liu Y. M., Fan L. J. Stem apex detoxification culture markedly improved several physiological characters of *Chrysanthemum* "YUTAI" // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2014. – № 119. – P. 369–381.

#### REFERENCES

1. Babenko DO, Mrachkovska YO, Krylova KD. Effect of *Bacillus megaterium* ONU500 strain on growing plants of *Lycopersicon esculentum*. In: Scientific Conference "Biotechnology for agriculture and environmental protection" (Odesa, September 2016): Abstracts. Odesa I.I. Mechnikov National University 2016:244 p. (in Ukrainian).
2. Zashchynska OS. Microbial Siderophores as Possible Factors of Antagonism of *Bacillus megaterium* Bacteria Against Pathogenic *Agrobacterium* spp. In: Collection of Materials of the Scientific Society of Students, Postgraduates, and Young Scientists. Odessa: Repository of the Scientific Library of Odesa I.I. Mechnikov National University, 2019. 39 p. (in Ukrainian).
3. Zelenianska NN, Dzhaburiiia LV, Tesliuk NI. Grapevine Propagation Technology Using *In Vitro* Tissue Culture Methods. *VinoGrad*. 2009;3:50-53 (in Ukrainian).
4. Ivanytsia VO, Shtenikov MD, Ostapchuk AM, Gorshkova OG, Tesliuk NI, Tytarenko NV, Gudzenko TV. Patent 126710 Ukraine, IPC A01N63/22. Strain *Bacillus velezensis* ONU553 - Producer of Lipopeptide Antibiotics, Antagonist of *Staphylococcus aureus* and Enterobacteria with Growth-Stimulating Activity. Kyiv: National Intellectual Property Office - State Organization "Ukrainian National Office of Intellectual Property and Innovations"; 2023 (in Ukrainian).
5. Koniushenko KI. Environmental Assessment of the Prospects for Using the Genus *Chrysanthemum* L. in Green Building in Zhytomyr: Qualification Work: Specialty 101 "Ecology". Polissia National University, Department of General Ecology, Scientific Supervisor S.I. Matkovska. Zhytomyr; 2020. 44 p. (in Ukrainian).
6. Ivanytsia VO, Gudzenko TV, Strashnova IV, Vasilieva NY, Shtenikov MD, Korotaeva NV, Lisyutin GV, Gorshkova OG, Voluvach OV, Potapenko KS, Bobrova OY, Ivanitsya TV, Filipova TO, Chaban MM, editors. Microbiological Studies of the Black Sea: Monograph. Odesa: Odesa I.I. Mechnikov National University; 2021. 282 p. (in Ukrainian).
7. Mrachkovska YO, Krylova KD, Galkin BM. Formation of a Biofilm by the Probiotic Strain *Bacillus megaterium* ONU500 on the Roots of *Lepidium*



- sativum* L. In: International Scientific Conference "Biology: From Molecule to Biosphere" (December 2-4, 2015, Kharkiv, Ukraine). Kharkiv: FOP Shapovalova TM; 2015 (in Ukrainian).
8. Tytarenko N, Tesliuk N, Ivanytsia V. Perspectives of using bacteria for cell and tissue plant culture. *Microbiology and biotechnology*. 2020; 3:6-31 (in Ukrainian).
  9. Shvets YA, Krylova KD, Limanska NV. Influence of *Bacillus megaterium* ONU 500 on Germination and Growth of Sunflower Seedlings. *Microbiology and Biotechnology*. 2021;1(51):45-54 (in Ukrainian).
  10. Agake S, Ohwaki Y, Kojima K, Yoshikawa E, Artigas Ramirez MD, Bellingrath-Kimura SD, Yamada T, Ookawa T, Ohkama-Ohtsu N, Yokoyama T. Biofertilizer with *Bacillus pumilus* TUAT1 Spores Improves Growth, Productivity, and Lodging Resistance in Forage Rice. *Agronomy*. 2022;12(10):2325.
  11. Datta SK. *Chrysanthemum morifolium* Ramat. - a unique genetic material for breeding. *Sc. Culture*. 2013;7(8):307-313.
  12. Deein W, Thepsithar C, Thongpukdee A. Growth of *Chrysanthemum* explants on MS medium sterilized by disinfectants and essential oils. *Int. J. Biosci., Biochem. Bioinformatics*. 2013;3(6):609-613.
  13. Getu M. Ethiopia floriculture and its impact on the environment. Regulation, Supervision and Compliance. *Mizan Law Rev*. 2009;3(2):242 p.
  14. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962;15(3):473-497.
  15. Teixeira da Silva JA, Kulus D. *Chrysanthemum* biotechnology: discoveries from the recent literature. *Folia Horticulturae*. 2014;26(2):67-77.
  16. Tymoszuk A, Zalewska M. *In vitro* adventitious shoot regeneration from ligulate florets in the aspect of application in *Chrysanthemum* breeding. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*. 2014;13(2):45-58.
  17. Zhou Y, Wang YY, Song YR, Gao ZY, Liu YM, Fan LJ. Stem apex detoxification culture markedly improved several physiological characters of *Chrysanthemum* "YUTAI". *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2014;119:369-381.

Стаття надійшла до редакції 10.09.2023 р.





УДК [615.1 + 616.9] + [616.33: 616.348] + 59.085.

**Б.М. Галкін, Т.В. Гладкій, Н.А. Кириленко**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна  
e-mail: bgalkin@ukr.net, hladky@onu.edu.ua, kiril-ko@ukr.net

## ВПЛИВ КОМБІНОВАНОЇ ФАРМАКОПРОФІЛАКТИКИ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ НА СТАН ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ

*Метою* роботи було дослідження можливості комбінованої фармакопрофілактики інфекційних захворювань при використанні антибіотиків у лабораторних тварин шляхом застосування комплексу препаратів, включаючи вітаміни та мінерали. *Методи.* Експеримент виконаний на 16-ти щурах віком 1,5 місяця: 8 – інтактні, 8 – фармакопрофілактика (Байтріл Байєр 10 мг/кг; аскорбінова кислота 2 г/л; розчин глюкози 50 г/л; Чіктонік 1мл/л; Байкокс 3 мл/л) впродовж 24 днів. Для біохімічних досліджень виділяли печінку, слизові оболонки шлунку, тонкої і товстої кишки, у яких визначали показники запалення (активність еластази та кислій фосфатази), стан неспецифічного антимікробного захисту (активність лізоциму), показник мікробного обмінення (активність уреаз). *Результати.* Фармакопрофілактика за схемою у слизових оболонках травного тракту щурів призвела до підвищення маркерів запалення (активності кислій фосфатази та еластази), розвитку дисбіозу (підвищення активності уреаз на тлі зменшення активності лізоциму). Більш значні зміни зареєстровано у слизовій оболонці товстої кишки. В печінці щурів встановлено збільшення активності еластази, кислій фосфатази та уреаз поряд зі зниженням активності лізоциму, що вказує на наявність запалення та порушення антитоксичної та антимікробної функцій печінки. *Висновок.* Дослідження показало недостатність використання вітамінно-мінерального комплексу, аскорбінової кислоти та глюкози як захисних компонентів травного тракту від негативної дії антибіотиків. Це диктує необхідність пошуку більш ефективних протекторних засобів, здатних запобігати негативним наслідкам прийому антибіотиків.

*Ключові слова:* щури, фармакопрофілактика інфекцій, антибіотики, травний тракт, запалення, дисбіоз.

Сучасні бройлери швидко ростуть і досягають товарного віку у віці 5 тижнів. Антибіотики широко використовуються як кормові добавки для підтримання оптимальної продуктивності, як стимулятори росту та для профілактики захворювань. За статистикою, споживання антибіотиків у тваринництві становило в 2010 році 148 мг/кг для птиці [11].

З іншого боку антибіотики можуть мати як прямий негативний вплив на клітини, так і опосередкований – через пригнічення нормальної мікробіоти,



що спричиняє розвиток дисбіозу, який характеризується порушенням взаємодії імунних систем макроорганізму та його мікробної системи. Баланс кишкової мікробіоти має вирішальне значення для високого рівня продуктивності тварин, особливо в умовах санітарних проблем [10].

Вирощування сільськогосподарських тварин в сучасних умовах неможливе без використання антибіотиків. У ветеринарії як антибактеріальний засіб широко використовується Байтріл Байер (енрофлоксацин). Це сполука з групи фторхінолонів, яка виявляє сильну антибіотичну активність проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, головним чином завдяки пригніченню ферментативної дії бактеріальної гірази та топоізомерази IV. Висока ефективність цього препарату була продемонстрована у лікуванні інфекційних хвороб різних тварин [7].

Як кокцидіостатик використовують 2,5% толтразурил (Байкокс), спектр дії якого охоплює всі внутрішньоклітинні стадії розвитку, за винятком ооцист, для роду *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. adenoides*, *E. meleagridis*, *E. anceris*, *E. truncata*) і має сильну антикокцидну дію до всіх видів кокцидіозу у курей, кролів, голубів, телят та ягнят [9].

Найпоширеніші побічні ефекти енрофлоксацину і толтразурилу пов'язані з кістковою, репродуктивною, нервовою, імунною системою та шлунково-кишковим трактом [12]. Тому поряд з антибактеріальними препаратами при вирощуванні сільськогосподарських тварин використовують вітамінно-мінеральні комплекси, які покращують апетит, сприяють стійкості до стресів та інфекційних захворювань, здійснюють позитивний вплив на стан шкірно-волосяного покриву та оперення у птахів [5].

Краще розуміння можливих змін в шлунково-кишковому тракті, пов'язаних із застосуванням антибактеріальних препаратів, не лише сприятиме раціональному використанню антибіотиків у птахівництві, але й допоможе у розробці потенційних профілактичних засобів, таких як пробіотики, пребіотики, органічні кислоти, ефірні олії, ферменти, імуностимулятори [6, 8], для відновлення можливих порушень після їхнього застосування.

Оскільки в літературі є відомості про розвиток запалення і дисбіозу у травному тракті тварин після застосування антибіотиків [1, 2, 4], ми вважали за доцільне перевірити експериментально протизапальну та антидисбіотичну ефективність відомої у птахівництві комбінованої фармакопрофілактики інфекційних захворювань (антибіотики у поєднанні з вітамінно-мінеральним комплексом). Для дослідження обрали щурів тому, що вони є дуже доброю моделлю для експериментальної роботи, а загальний обмін речовин суттєво не відрізняється від такого у птахів.

**Метою** роботи було дослідження можливості комбінованої фармакопрофілактики інфекційних захворювань при використанні антибіотиків у лабораторних тварин шляхом застосування комплексу препаратів, включаючи вітаміни та мінерали.

### Матеріали та методи

Експеримент виконаний у віварії ОНУ імені І. І. Мечникова на 16-ти білих лабораторних щурах 1,5 місячного віку масою 60–85 г. Тварин утри-



мували в стандартних умовах світлового режиму і харчовому раціоні віварію університету. Щури були випадковим чином розділені на 2 групи: 1-а група: інтактні тварини ( $n = 8$ ); 2-а група: курс комбінованої фармакопрофілактики ( $n = 8$ ).

Фармакопрофілактику інфекційних хвороб тваринам 2-ої групи проводили впродовж 24 днів по схемі, що використовують в птахівництві [5]:

- 7 діб Байтріл Байер (енрофлоксацин, ТОВ «Вауег», Німеччина) 10 мг/кг;
- 6 діб аскорбінова кислота (ТОВ «Укрветбіофарм», Україна) 2 г/л і розчин глюкози (ПАТ «Фармак», Україна) 50 г/л питної води;
- 5 діб Чіктонік (вітамінно-мінеральний препарат; ТОВ «Інвеса», Іспанія) 1мл/л питної води;
- 6 діб Байкокс 2,5% (кокцидіостатик ТОВ «Вауег», Німеччина) 3 мл/л питної води.

Утримання та виведення тварин з експерименту здійснювалося у відповідності до положень, встановлених Директивою Європейського парламенту та Ради (2010/63/EU) [Hartung, 2010] та наказом Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України від 01.03.2012 р. № 249 [Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах].

Тварин виводили з експерименту на 35 добу, тобто через 10 днів після закінчення фармакопрофілактики, шляхом тотального кровопускання з серця під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). Для досліджень виділяли печінку, слизові оболонки шлунку, тонкої і товстої кишки, у яких проводили визначення активності лізоциму (відбиває стан неспецифічного антимікробного захисту), активності уреазы (показник мікробного обсіменіння), а також визначали показники запалення – активність еластази та кислотої фосфатази [3]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням  $t$ -критерію Стьюдента.

### Результати та їх обговорення

В таблиці 1 представлені результати визначення у слизовій оболонці шлунку тварин, що отримували фармакопрофілактику по схемі, маркерів запалення, мікробного обсіменіння та показника антимікробного захисту. Введення комплексу вищезгаданих препаратів сприяло зростанню активності еластази на 63,6% ( $p < 0,001$ ) та активності кислотої фосфатази – на 26,9% ( $p < 0,05$ ). Ступінь еластазної активності відображає інтенсивність запалення та деструктивних змін в слизовій оболонці. Кислота фосфатаза – лізосомальний фермент, який при запальному процесі і руйнуванні лізосом, вивільняється та пошкоджує клітину. Збільшення активності кислотої фосфатази розглядається як неспецифічна ознака запалення, що свідчить про ураження даного органу. Отримані результати говорять про активацію запальних процесів у слизовій оболонці шлунку щурів після перорального застосування енрофлоксацину, аскорбінової кислоти, глюкози, вітамінно-мінерального препарату, кокцидіостатику (табл. 1).

Крім того, у слизовій оболонці шлунку експериментальних тварин встановлено зменшення активності лізоциму на 41,6% ( $p < 0,005$ ). Це вказує на зниження рівня неспецифічного антимікробного захисту слизової обо-





лонки шлунку після проведеного досліджу і може стати причиною розмноження умовно-патогенних бактерій. Збільшення активності уреазу на 58,1% ( $p < 0,05$ ) у слизовій оболонці шлунку щурів, які отримували комбіновану фармакопрофілактику, підтвердило посилену контамінацію умовно-патогенною мікробіотою (табл. 1).

Таблиця 1

**Показники запалення та дисбіозу у слизовій оболонці шлунку щурів після комбінованої фармакопрофілактики ( $M \pm m$ )**

Table 1

**Indicators of inflammation and dysbiosis in the gastric mucosa of rats after combined pharmacoprophylaxis ( $M \pm m$ )**

Показники	Групи тварин	
	Інтактна	Комбінована фармакопрофілактика
Активність еластази, мккат/кг	89,87 ± 5,34	174,03 ± 11,76 $p < 0,001$
Активність кислої фосфатази, мккат/кг	40,47 ± 1,83	51,37 ± 4,48 $p < 0,05$
Активність уреазу, мккат/кг	0,555 ± 0,071	0,872 ± 0,052 $p < 0,05$
Активність лізоциму, од/г	0,012 ± 0,001	0,007 ± 0,001 $p < 0,005$

Примітка:  $p$  – достовірність по відношенню до показників інтактної групи.  
Note:  $p$  – the reliability of the discrepancy of indicators compared to the intact group.

За результатами визначення показників у слизовій оболонці тонкої кишки щурів, що наведено у таблиці 2, зареєстровано збільшення активності еластази на 85,7% ( $p < 0,001$ ) у щурят, яким проводили фармакопрофілактику. Спостерігалось також достовірне збільшення другого маркера запалення – кислої фосфатази, активність якої зросла на 54,8% ( $p < 0,002$ ), що поряд з активацією еластази свідчить про наявність запалення в слизовій оболонці тонкої кишки щурят після застосування комбінованої фармакопрофілактики.

Активність лізоциму у слизовій оболонці тонкої кишки щурят 2-ої групи знизилася на 61,1% ( $p < 0,005$ ), що вказує на суттєве зниження неспецифічного антимікробного захисту у цьому біотопі під впливом препаратів (табл. 2). Наслідком чого було підвищення активності уреазу на 69,0% (табл. 2,  $p < 0,05$ ). Отримані дані свідчать про посилення мікробного обсіменіння слизової оболонки тонкої кишки тварин після проведення комбінованої фармакопрофілактики, а саме застосування енрофлораксацину, аскорбінової кислоти, глюкози, вітамінно-мінерального препарату, кокцидіостатику.

В гомогенатах слизової оболонки товстої кишки щурят після застосування комбінованої фармакопрофілактики (табл. 3) спостерігали збільшення протеолітичної активності еластази у 2,9 рази ( $p < 0,001$ ) та активності кислої



Таблиця 2

**Показники запалення та дисбіозу у слизовій оболонці тонкої кишки щурів після комбінованої фармакопрофілактики (M ± m)**

Table 2

**Indicators of inflammation and dysbiosis in the mucous membrane of the small intestine of rats after combined pharmacoprohylaxis (M ± m)**

Показники	Групи тварин	
	Інтактна	Комбінована фармакопрофілактика
Активність еластази, мккат/кг	899,82 ± 93,20	1670, 80 ± 136,50 p < 0,001
Активність кислої фосфатази, мккат/кг	28,30 ± 2,33	43,80 ± 3,50 p < 0,002
Активність уреазу, мккат/кг	0,100 ± 0,012	0,169 ± 0,017 p < 0,05
Активність лізоциму, од/г	0,198 ± 0,032	0,077 ± 0,013 p < 0,005

Примітка: p – достовірність по відношенню до показників інтактної групи.  
Note: p – the reliability of the discrepancy of indicators compared to the intact group.

фосфатази – на 43,4% (p < 0,005). Активність уреазу у слизовій оболонці товстої кишки експериментальної групи тварин збільшилася на 60,9% (табл. 3, p < 0,001) щодо значень інтактних тварин. Це може бути наслідком суттєвого зниження активності лізоциму у щурят після введення препаратів комплексу. Показник антимікробного захисту знизився у 5,8 разів відносно значень у інтактній групі тварин (p < 0,001).

Результати визначення біохімічних маркерів у печінці щурів після застосування комбінованої фармакопрофілактики наведені у таблиці 4. Як видно з даних цієї таблиці, у щурят, які отримували комплекс антибіотиків, вітамінів та мінералів, був достовірно підвищений рівень обох маркерів запалення. Так, в печінці зросла активність еластази – на 21,6% (p < 0,02), а активність кислої фосфатази перевищувала показник у інтактних тварин на 24,5% (p < 0,001), що вказує на ушкодження та руйнування гепатоцитів тварин на тлі застосування комбінованої схеми фармакопрофілактики. Збільшення активності уреазу у 2,1 рази (p < 0,001) у печінці щурів після застосування комбінованої фармакопрофілактики свідчить про порушення антитоксичної функції печінки. Поряд із розвитком запальних і токсичних процесів у печінці щурів використання фармакопрофілактики індукувало зниження неспецифічного антимікробного захисту, про що говорить падіння активності лізоциму на 51,7% (p < 0,001) у печінці тварин після прийому препаратів комплексу.

Таким чином, в результаті проведення біохімічних досліджень печінки та слизових оболонок шлунково-кишкового тракту було встановлено, що пероральне введення комбінованої схеми фармакопрофілактики (енрофлокса-



Таблиця 3

**Показники запалення та дисбіозу у слизовій оболонці товстої кишки щурів після комбінованої фармакопрофілактики (M ± m)**

Table 3

**Indicators of inflammation and dysbiosis in the mucous membrane of the large intestine of rats after combined pharmacoprophylaxis (M ± m)**

Показники	Групи тварин	
	Інтактна	Комбінована фармакопрофілактика
Активність еластази, нкат/кг	185,27 ± 13,40	531,27 ± 32,89 p < 0,001
Активність кислій фосфатази, мккат/кг	33,76 ± 4,34	48,40 ± 0,90 p < 0,005
Активність уреазі, мккат/кг	1,53 ± 0,13	3,91 ± 0,23 p < 0,001
Активність лізоциму, од/г	0,052 ± 0,008	0,009 ± 0,001 p < 0,001

Примітка: p – достовірність розбіжності показників порівняно з інтактною групою.

Note: p – the reliability of the discrepancy of indicators compared to the intact group.

Таблиця 4

**Показники запалення та токсикозу у печінці щурів після комбінованої фармакопрофілактики (M ± m)**

Table 4

**Indicators of inflammation and toxicosis in the liver of rats after combined pharmacoprophylaxis (M ± m)**

Показники	Групи тварин	
	Інтактна	Комбінована фармакопрофілактика
Активність еластази, мккат/кг	363,20 ± 26,02	441,53 ± 19,17 p < 0,02
Активність кислій фосфатази, мккат/кг	170,58 ± 7,66	212,40 ± 7,78 p < 0,001
Активність уреазі, мккат/кг	0,158 ± 0,013	0,332 ± 0,024 p < 0,001
Активність лізоциму, од/г	0,060 ± 0,003	0,029 ± 0,001 p < 0,001

Примітка. p – достовірність розбіжності показників порівняно з інтактною групою.

Note: p – the reliability of the discrepancy of indicators compared to the intact group.



цин, аскорбінова кислота, глюкоза, комплексний вітамінно-мінеральний препарат, кокцидіостатик) провокує цілий ряд порушень у шлунково-кишковому тракті дослідних тварин – руйнування клітинних мембран, розвиток запалення і дисбіозу, що відбувається внаслідок зниження антимікробного захисту.

Виявлені порушення в шлунково-кишковому тракті тварин, які отримували антибіотики в поєднанні з вітамінами і мікроелементами, не можуть вплинути на здатність слизових оболонок травного тракту повноцінно здійснювати перетравлення, гідроліз і всмоктування нутрієнтів. Отримані результати показали недостатність використання вітамінно-мінерального комплексу, аскорбінової кислоти та глюкози як захисних компонентів шлунково-кишкового тракту від негативної дії антибіотиків. Тому, результати нашого дослідження диктують необхідність пошуку більш ефективних протекторних засобів, здатних запобігати негативним наслідкам прийому антибіотиків: розладам у травному тракті та порушенню функції печінки.

Введення комбінованої фармакопрофілактики молодим щурам призвело до підвищення маркерів запалення у слизових оболонках травного тракту: активності кислої фосфатази – на 26,9–54,8%, еластази – на 63,6–186,8%. Більш значні зміни зареєстровано у слизовій оболонці товстої кишки.

Пероральне застосування енрофлоксацину, аскорбінової кислоти, глюкози, вітамінно-мінерального препарату, кокцидіостатику викликало у слизових оболонках шлунково-кишкового тракту щурів підвищення активності уреазу у середньому на 62,7% на тлі зменшення активності лізоциму на 41,6–82,7% (особливо в слизовій оболонці товстої кишки), що говорить про розвиток дисбіозу.

В печінці щурів проведення комплексної фармакопрофілактики інфекцій сприяло збільшенню активності еластази на 21,6%, кислої фосфатази – на 24,5% та уреазу – на 110,1% поряд зі зниженням активності лізоциму на 51,7%, що вказує на наявність запалення та порушення антитоксичної та антимікробної функцій печінки.

**B.M. Galkin, T.V. Hladkii, N.A. Kyrylenko**

Odesa I.I. Mechnikov National University,  
2, Dvoryanska Str., Odesa, 65082, Ukraine  
e-mail: bgalkin@ukr.net, hladky@onu.edu.ua, kiril-ko@ukr.net

## INFLUENCE OF COMBINED PHARMACOPROPHYLAXIS OF INFECTIOUS DISEASES ON THE CONDITION OF THE GASTROINTESTINAL TRACT OF LABORATORY RATS

### Summary

*The aim of the work was studying the possibility of combined pharmacoprophylaxis of infectious diseases during the use of antibiotics in laboratory animals by applying a complex of medicines, including vitamins and minerals. **Methods.** The experiment was performed on 16 rats aged 1.5 months: 8 – intact, 8 – pharmacoprophylaxis (Baytril Bayer 10 mg/kg; ascorbic acid 2 g/l; glucose solution*



50 g/l; Chiktonic 1 ml/l; Baycox 3 ml/l) within 24 days. For biochemical studies, the liver, mucous membranes of the stomach, small and large intestine were isolated, in which indicators of inflammation (activity of elastase and acid phosphatase), the state of non-specific antimicrobial protection (activity of lysozyme), indicator of microbial insemination (activity of urease) were determined. **Results.** Pharmacoprophylaxis according to the scheme in the mucous membranes of the digestive tract of rats led to an increase in markers of inflammation (activity of acid phosphatase and elastase), development of dysbiosis (increase in urease activity against the background of decrease in lysozyme activity). More significant changes were registered in the mucous membrane of the large intestine. In the liver of rats, an increase in the activity of elastase, acid phosphatase and urease was established along with decrease in the activity of lysozyme, which indicates the presence of inflammation and a violation of the antitoxic and antimicrobial functions of the liver. **Conclusion.** The study showed the insufficiency of the use of vitamin-mineral complex, ascorbic acid and glucose as protective components of the digestive tract against the negative effects of antibiotics. This dictates the need to find more effective protective agents, capable of preventing the negative effects of antibiotics.

*Key words:* rats, pharmacoprevention of infections, antibiotics, digestive tract, inflammation, dysbiosis.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Голота Ю.В.* Біохімічні показники стану кишкового бар'єру у віддалені терміни після введення цефтриаксону : автореф. дис. ... канд. біол. наук : спец. 03.00.04 «Біохімія». – Київ, 2017. – 22 с.
2. *Левицкий А.П., Макаренко О.А., Майкова А.В., Коломийчук Т.В., Павличенко О.Д.* Активность лизоцима в печени и дисбиоз толстой кишки после экспериментальной антибиотикотерапии // ScienceRise: Biological Science. – 2017. – № 5(8). – С. 7–11.
3. *Макаренко О.А., Хромагіна Л.М., Ходаков І.В., Майкова Г.В., Мудрик Л.М., Кіка В.В., Могилевська Т.В.* Методи дослідження стану кишечнику та кісток у лабораторних щурів. Довідник. – Одеса: видавець С.Л. Назарчук, 2022. – 81 с.
4. *Павличенко О.Д., Макаренко О.А., Хромагіна Л.Н., Голованова А.И.* Воспалительные осложнения в желудочно-кишечном тракте после экспериментальной антибиотикотерапии // Биохимия и молекулярная биология. – 2019. – № 3. – С.225–229.
5. *Проваторов П.В.* Норми годівлі, раціони і поживність кормів для різних видів сільськогосподарських тварин. К.: Університетська книга, 2019. 490 с.
6. *Abd El-Hack M.E., El-Saadony M.T., Salem H.M., El-Tahan A.M., Soliman M.M., Youssef G.B.A., Taha A.E., Soliman S.M., Ahmed A.E., El-Kott A.F., Al Syaad K.M., Swelum A.A.* Alternatives to antibiotics for organic poultry production: types, modes of action and impacts on bird's health and production // Poult Sci. – 2022. – Apr;101(4). – P. 1–20. doi: 10.1016/j.psj.2022.101696.
7. *Grabowski Ł., Gaffke L., Pierzynowska K., Cyske Z., Choszcz M., Węgrzyn G., Węgrzyn A.* Enrofloxacin-The Ruthless Killer of Eukaryotic Cells or the



- Last Hope in the Fight against Bacterial Infections? // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Mar 26;23(7). – P. 1–22. doi: 10.3390/ijms23073648.
8. He Y., Liu X., Dong Y., Lei J., Ito K., Zhang B. Enterococcus faecium PNC01 isolated from the intestinal mucosa of chicken as an alternative for antibiotics to reduce feed conversion rate in broiler chickens // *Microb Cell Fact.* – 2021. – Jun. – P. 1–14. doi: 10.1186/s12934-021-01609-z.
  9. Kandeel M. Efficacy of amprolium and toltrazuril in chicken with subclinical infection of cecal coccidiosis // *Indian J Pharmacol.* – 2011. – Nov; 43(6). – P. 741–743. doi: 10.4103/0253-7613.89845.
  10. Kers J. G., Velkers F. C., Fischer E. A. J., Hermes G. D. A., Stegeman J. A., Smidt H. Host and Environmental Factors Affecting the Intestinal Microbiota in Chickens // *Front Microbiol.* – 2018. – Feb. – P. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2018.00235.
  11. Laxminarayan R., Van Boeckel T., Frost I., Kariuki S., Khan E.A., Limmathurotsakul D., Larsson D.G.J., Levy-Hara G., Mendelson M., Outtersson K., Peacock S.J., Zhu Y.G. The Lancet Infectious Diseases Commission on antimicrobial resistance: 6 years later // *Lancet Infect Dis.* – 2020. – Apr, 20(4). – P. 1–10. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30003-7.
  12. Troughon T., Lefebvre A.A. Review of Enrofloxacin for Veterinary Use // *Open J. Vet. Med.* – 2016. – 6. – P. 40–58. doi: 10.4236/ojvm.2016.62006.

#### REFERENCES

1. Holota YuV. Biochemical indicators of the state of the intestinal barrier in the long term after ceftriaxone administration: avtoref. dys. ... kand. biol. science: spets. 03.00.04 «Biochemistry», Kyiv, 2017:22. (in Ukrainian)
2. Levytskyi AP, Makarenko OA, Maikova AV, Kolomyichuk TV, Pavlychenko OD. Liver lysozyme activity and colonic dysbiosis after experimental antibiotic therapy. *ScienceRise: Biological Science.* 2017; № 5(8): 7-11. (in Russian)
3. Makarenko OA, Khromahina LM, Khodakov IV, Maikova HV, Mudryk LM, Kika VV, Mogilevska TV. Methods of studying the condition of the intestines and bones in laboratory rats. Odesa Publisher S.L. Nazarchuk. 2022:81. (in Ukrainian)
4. Pavlychenko OD, Makarenko OA, Khromahyna LN, Holovanova AI Inflammatory complications in the gastrointestinal tract field of experimental antibiotic therapy. *Biochemistry and molecular biology.* 2019; № 3: 225-229. (in Russian)
5. Provatorov PV. Norms of age, rations and nutrition of fodder for different types of farm animals. Kyiv: University book, 2019:490. (in Ukrainian)
6. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Salem HM, El-Tahan AM, Soliman MM, Youssef GBA, Taha AE, Soliman SM, Ahmed AE, El-Kott AF, Al Syaad KM, Swelum AA. Alternatives to antibiotics for organic poultry production: types, modes of action and impacts on bird's health and production. *Poult Sci.* 2022; Apr;101(4): 1-20. doi: 10.1016/j.psj.2022.101696.
7. Grabowski Ł, Gaffke L, Pierzynowska K, Cyske Z, Choszcz M, Węgrzyn G, Węgrzyn A. Enrofloxacin-The Ruthless Killer of Eukaryotic Cells or the





- Last Hope in the Fight against Bacterial Infections? *Int J Mol Sci.* 2022; Mar 26;23(7): 1-22. doi: 10.3390/ijms23073648.
8. He Y, Liu X, Dong Y, Lei J, Ito K, Zhang B. *Enterococcus faecium* PNC01 isolated from the intestinal mucosa of chicken as an alternative for antibiotics to reduce feed conversion rate in broiler chickens. *Microb Cell Fact.* 2021; Jun: 1-14. doi: 10.1186/s12934-021-01609-z.
  9. Kandeel M. Efficacy of amprolium and toltrazuril in chicken with subclinical infection of cecal coccidiosis. *Indian J Pharmacol.* 2011; Nov;43(6): 741-743. doi: 10.4103/0253-7613.89845.
  10. Kers JG, Velkers FC, Fischer EAJ, Hermes GDA, Stegeman JA, Smidt H. Host and Environmental Factors Affecting the Intestinal Microbiota in Chickens. *Front Microbiol.* 2018; Feb: 1-14. doi: 10.3389/fmicb.2018.00235.
  11. Laxminarayan R, Van Boeckel T, Frost I, Kariuki S, Khan EA, Limmathurotsakul D, Larsson DGJ, Levy-Hara G, Mendelson M, Outtersson K, Peacock SJ, Zhu YG. The Lancet Infectious Diseases Commission on antimicrobial resistance: 6 years later. *Lancet Infect Dis.* 2020; Apr;20(4): P. 1-10. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30003-7.
  12. Trouchon T, Lefebvere A. A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Open J. Vet. Med.* 2016; 6: P. 40-58. doi: 10.4236/ojvm.

Стаття надійшла до редакції 04.09.2023 р.



UDC 579.68

**T.V. Gudzenko, I.V. Strashnova, O.G. Gorshkova,  
G.V. Lisiutin, M.D. Shtenikov, V.I. Sachkovska**

Odesa I. I. Mechnikov National University,  
Dvorianska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine,  
e-mail: [tgudzenko@ukr.net](mailto:tgudzenko@ukr.net)

## **MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF THE BLACK SEA STRAIN *STREPTOMYCES* SP. LIM 10**

**Aim.** The aim of the work was to study the morphological characteristics and cytotoxic activity of the strain of actinobacteria *Streptomyces* sp. Lim 10 isolated from natural fouling of shell rock in the Odesa Bay of the Black Sea. **Materials and methods.** The object of the study was a strain of marine actinobacteria *Streptomyces* sp. Lim 10. The morphology and growth patterns were studied on the media of Gauze 2, Czapek, Eshbi, TSB and on the media of ISP (ISP-1–ISP-7). SG medium was used to accumulate secondary metabolites of actinobacteria. Extraction of exometabolites from the culture liquid was carried out with ethyl acetate followed by dissolution in dimethyl sulfoxide (DMSO). The cytotoxic activity of exometabolites of actinobacteria strain *Streptomyces* sp. Lim 10 was studied on the model of cultures cells human - rhabdomyosarcoma (RD,) and of the laryngeal adenocarcinoma (Hep-2). The cytotoxic effect of exometabolites of the actinobacteria strain *Streptomyces* sp. Lim 10 was determined after 24 hours of incubation by microscopy. The degree of destruction of the monolayer was assessed by the number of viable cells in terms of optical density, which was measured using a spectrophotometer at a wavelength of 630 nm. The exometabolites of actinobacteria strain *Streptomyces* sp. Lim 10 were identified using LC-ESIMS. **Results.** Study of the morphological properties of the Black Sea strain of actinobacteria Lim 10 showed that it is characterized by pleomorphism. A high cytotoxic activity of exometabolites of the marine strain of actinobacteria *Streptomyces* sp. Lim 10 was established. The level of cytotoxic effect of metabolites of the strain of actinobacteria *Streptomyces* sp. Lim 10 on Hep-2 cell culture depended on their concentration. RD cell culture was more sensitive to the cytotoxic effect of exometabolites of *Streptomyces* sp. Lim 10 – at all tested concentrations of exometabolites (from 2.5 to 500.0 µg/ml), the number of viable cells in the RD monolayer decreased to  $51.3 \pm 3.0 - 63.7 \pm 5.4\%$ , compared to the control. This can be at least partially explained by action of apoptosis-inducing agent staurosporine, which is produced by strain *Streptomyces* sp. Lim 10 along with its structural homologs. **Conclusion.** Strain *Streptomyces* sp. Lim 10 is a promising producer of antitumor compounds and can be recommended for further more in-depth studies.

**Key words:** *Streptomyces*, Black Sea, morphological characteristics, exometabolites, cytotoxic activity.



**Introduction.** Actinobacteria are a widespread group of microorganisms in natural ecosystems that have been used as a source of material to search for useful secondary metabolites with antibiotic activity [2, 8].

Actinobacteria inhabit soils, and fresh and seawater bodies. Marine actinobacteria were first discovered in 1984. Since then, many representative species of marine actinobacteria have been found in aquatic systems around the world, and some species are very common in the world's oceans.

Today, marine actinobacteria are of active academic and commercial interest, as they live in a unique environment that facilitates the synthesis of new biologically active metabolites [3, 4, 12].

Actinobacteria are considered as one of the most important sources of biologically active compounds for the pharmaceutical industry, currently more than 5000 secondary metabolites with antibiotic activity have been identified.

According to some predictions, actinobacteria can produce up to 150000 different chemical antimicrobial agents [11, 13].

Secondary metabolites of actinobacteria differ in their various biological activities. Among actinobacteria, the genus *Streptomyces* deserves special attention, since this genus is the main source of bioactive molecules, bacteria of each strain are potentially able to produce up to 20 secondary metabolites with antimicrobial, antitumor, or anti-inflammatory activity [7, 9].

They are producers of biologically active substances that are actively used in the pharmaceutical industry, including antibiotics, exopolysaccharides, surfactants, antiviral, cytotoxic agents and enzyme inhibitors.

Marine strains of the genus *Streptomyces* are characterized as the most important producers of bioactive microbial metabolites with antitumor activity. For example, two rare steroidal alkaloids, anandin A and B, were identified in the marine actinobacteria *Streptomyces anandii* H41-59. Anandin A exhibited an inhibitory effect against the human mammary ductal adenocarcinoma cell line MCF-7, the human glioblastoma cell line SF-268, and the human lung epithelial carcinoma cell line NCI-H460 with IC<sub>50</sub> values of 7.5, 7.9, 7.8 µg/mL, respectively [14].

Four new sesquiterpenoid naphthoquinones, marfuraquinocins A-D (1–4), and two new geranylated phenazines, phenaziterpenes A (5) and B (6), were isolated from the fermentation broth of *Streptomyces niveus* SCSIO 3406, which originated from a South China Sea sediment sample obtained from a depth of 3536 m. In a panel of cytotoxicity and antibacterial assays, 1 and 3 were found to inhibit a NCI-H460 cancer cell line with IC<sub>50</sub> values of 3.7 and 4.4 µM, respectively.

Compounds 1, 3, and 4 exhibited antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 with equivalent MIC values of 8.0 µg/mL; compounds 3 and 4 each showed antibacterial activity against methicillin-resistant (MRSE) *Staphylococcus epidermidis* shhs-E1 with MIC values of 8.0 µg/mL [15].

Thus, marine strains of bacteria of the genus *Streptomyces* are characterized as major producers of bioactive microbial metabolites with antitumor activity.

The aim of the work was to study the morphological characteristics and cytotoxic activity of the strain of actinobacteria *Streptomyces* sp. Lim 10 isolated from natural fouling of shell rock in the Odesa Bay of the Black Sea.



**Materials and methods.** The object of the study was a strain of marine bacteria *Streptomyces sp.* Lim 10, which is stored in the collection of microorganisms of the Department of Microbiology, Virology and Biotechnology of Odesa I. I. Mechnikov National University. Isolated from the fouling of natural shell rock collected at a depth of 0.2–1.0 m in the Odesa Bay of the Black Sea near the Hydrobiological Station of Odesa I. I. Mechnikov National University (Odesa, Ukraine, 46°27'01''N 30°46'14''E).

Nutrient media such as Gause 2, Chapek, and Eshby were used to isolate actinobacteria [1]. The morphology and growth patterns were studied on the media of Gauze 2, Czapek, Eshbi, TSB, and on the media of ISP (ISP-1–ISP-7), according to the International Project of Streptomyces (ISP), during 14–21 days at 28 °C.

Synthesis of melanoid pigments was studied on ISP-6 and ISP-7 media by cultivating *Streptomyces sp.* Lim 10 for 14–21 days at 28 °C. Cell morphology was studied by microscopy of fixed preparations stained with a water solution of Pfeiffer's fuchsin (light microscope, x1500).

To obtain exometabolites, the studied strain of actinobacteria were grown in 500 ml flasks with glass balls on SG medium (Soy Glucose Broth: glucose – 20.0; yeast extract – 5.0; soy peptone – 10.0; calcium carbonate – 2.0 g/L) at 28 °C by culturing on a rotary shaker for 7 days at 180 rpm.

The cell mass of actinobacteria was separated by centrifugation at 10,000 g for 10 minutes. Exometabolites were extracted from the culture liquid with ethyl acetate in an equal ratio on a horizontal shaker with gentle agitation for 2 hours at room temperature [11].

The extract was taken using a 250 ml separatory funnel and ethyl acetate was evaporated at 40 °C in a stream of gaseous nitrogen. The mass of the dried extract was determined on an analytical balance and dissolved in an appropriate volume of dimethyl sulfoxide (DMSO). Working solutions of exometabolites were prepared with the applied nutrient medium for cell cultures.

The cytotoxic activity of exometabolites a strain of marine bacteria *Streptomyces sp.* Lim 10 was studied on the model of a monolayer of cultures of malignant cells of human – human rhabdomyosarcoma (RD) and of the human laryngeal adenocarcinoma (Hep-2), maintained in the museum collection of the Department of Microbiology, Virology and Biotechnology of the Odesa I. I. Mechnikov National University.

Cultures of Hep-2 and RD cells were seeded in 96-well plates with 100 µl of DMEM medium (BioWest, France) with the addition of antibiotics penicillin and streptomycin at a concentration of 100 U/ml, fetal bovine serum (FBS Premium) (BioWest, France) in the amount 10%. The seed concentration of cells is  $4 \times 10^4$  cells/ml. Cell cultures were incubated at 36 °C in a CCL-050T-8 CO<sub>2</sub> incubator for 24 hours [5].

Then exometabolites of strain *Streptomyces sp.* Lim 10 were added to each well at a concentration of: 2.5; 25.0; 50.0; 100.0; 250.0; 500.0 µg/ml of dried native extract. Controls were intact cell cultures in DMEM medium and cell cultures in DMEM medium with the addition of DMSO in the following concentrations of 0.5; 0.25; 0.1; 0.05; 0.025; 0.0025%.



After 24 h the cells were fixed by adding 100  $\mu$ l of 70% ethanol to the wells. Incubated for 15 min at a temperature of 20 °C. Then the ethanol was removed from the plates and added 100  $\mu$ l of methylene blue dye. Incubated for 15 min at room temperature. Then the plates were washed three times with tap water to remove the dye, incubated for 2 h at 37 °C.

The dye was eluted from the cells of the monolayer by adding 100  $\mu$ l of 0.1 mol/L HCl to each plate well, and incubated for 5 min at room temperature [5].

The cytotoxic effect of exometabolites of the strain of marine actinobacteria Lim 10 was determined after 24 hours of incubation. Morphological changes of cells were determined by microscopy of the cell monolayer. The degree of destruction of the monolayer was assessed by the number of viable cells in terms of optical density (OD), which was measured using a spectrophotometer for microplates at a wavelength of 630 nm.

The composition of exometabolites of the marine strain Lim 10 was determined on a ThermoFischer Dionex UltiMate™ 3000 BioRS UPLC system connected to a Bruker Daltonics maXis II mass spectrometer (4G hr-ToF) A Waters BEH C18 column (100 mm x 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m) was used ) at a temperature of 45 °C and a flow rate of 0,5 ml/min.

The following solvents were used: A – formic acid at a concentration of 0.1%; B – 100:20 acetonitrile + formic acid at 0.1%.

Detection took place in the range of 150–2000 m/z and 200–600 nm.

The exometabolites of strain *Streptomyces sp.* Lim 10 were identified using the electronic version of the Dictionary of Natural Products [6].

Mathematical processing of the results was carried out using Microsoft Office Excel-2016. The significance of differences between the mean values was determined by Student's t-test at a significance level of 95% ( $p < 0.05$ ).

**Results.** When actinobacteria strain *Streptomyces sp.* Lim 10 were inoculated on the dense medium of Gauze 2, Eshby, individual large colonies grew after 5 days.

On Gauze 2 medium, after 5 days of cultivation, the bacteria of this strain formed colonies with developed white aerial mycelium. It was well removable with a loop from the surface of the colony (Fig. 1).



Fig. 1. Morphology of *Streptomyces sp.* Lim 10 strain colonies on Gauze 2 nutrient medium. Exposure for 5 days



Similar colonies of bacteria of the strain were formed on Eshby's medium; on this medium, the aerial mycelium was cream-colored.

Strain *Streptomyces sp.* Lim 10 on agarized nutrient media (Gauze 2, Eshby, Chapek) produced a dark brown water-soluble pigment that diffused into the medium.

During the cultivation of actinobacteria strain *Streptomyces sp.* Lim 10 on TSB liquid nutrient medium, the most active production of water-soluble dark brown pigment was observed (Fig. 2).

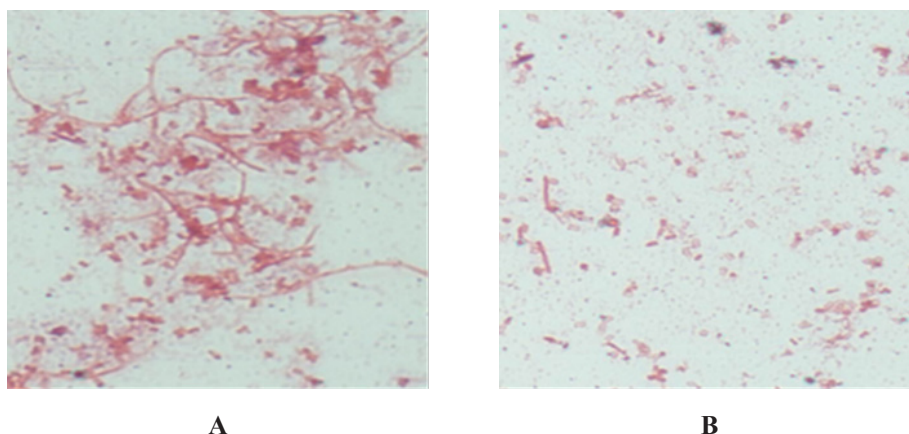


**Fig. 2. Accumulation of water-soluble dark brown pigment during cultivation of strain *Streptomyces sp.* Lim 10 on liquid TSB nutrient medium. Exposure 10 days**

At the same time, the bacteria of the strain did not synthesize melanoid pigments, the ability to synthesize which was determined on media ISP-6 and ISP-7.

The bacteria of the strain grew well on all ISP media, which differ in the composition of nutrients and trace elements.

Various forms of actinobacteria *Streptomyces sp.* were observed in the preparations. Lim 10: from filiform to cocci (Fig. 3).



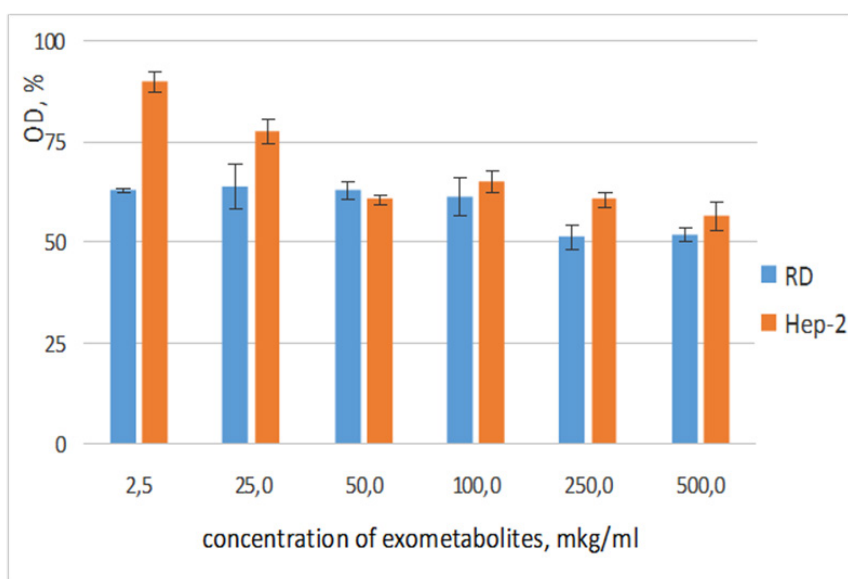
**Fig. 3. Cell morphology of actinobacteria strain *Streptomyces sp.* Lim 10. A – filamentous cells; B – rods and cocci. Bright-field microscopy, Pfeiffer magenta stain (x1500)**



Cells were mostly represented by short rods of small size, which were arranged singly, in pairs in chains, V-shaped, chaotic. Long filamentous cells were also detected, and some cells had a fragmented coccoid shape.

The marine strain of actinobacteria *Streptomyces sp.* Lim 10 is characterized by pleomorphism and intraspecific variability that are characteristic of actinobacteria. Based on the study of biological properties, the marine strain Lim 10 was confirmed to belong to the genus *Streptomyces*.

On the model of cultures of human malignant cells – connective tissue - human rhabdomyosarcoma RD and glandular epithelium cells – adenocarcinoma of the human larynx Hep-2, a high cytotoxic activity of exometabolites of the marine strain of *Streptomyces sp.* Lim 10 in a concentration from 250.0 to 500.0  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 4).



**Fig. 4. Cytotoxic effect of exometabolites of actinobacteria *Streptomyces sp.* Lim 10 on the viability of cells in a monolayer of Hep-2 and RD cultures according to the OD indicator, %\* (exposure for 24 hours)**

Note: \*in percentage of viable cells to control with DMSO

After 24 hours of exposure, morphological changes were detected in tumor cultures of human Hep-2 and RD cells - rounding of cells, vacuolization of the cytoplasm, shrinkage and pyknosis of the nucleus, and destruction of the monolayer (Fig. 5).

The level of cytotoxic effect on Hep-2 cell cultures depended on the concentration of exometabolites of *Streptomyces sp.* Lim 10. There was a high level of cytotoxicity at concentrations of exometabolites from 50.0 to 500.0  $\mu\text{g/ml}$  – the number of viable cells in the Hep-2 monolayer decreased to  $56.5 \pm 3.3$  –  $60.5 \pm 1.9\%$ , compared to the control DMSO. A weak cytotoxic effect in the culture of Hep-2 cells was registered for the concentration of exometabolites of *Streptomyces sp.* Lim 10. In concentration range from 2.5 to 25.0  $\mu\text{g/ml}$  – the number of viable

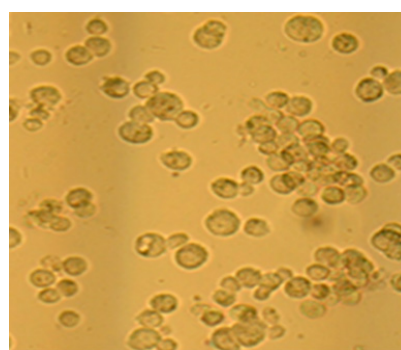
cells in the monolayer decreased to  $89.7 \pm 2.4 - 77.4 \pm 3.0\%$ , compared to the DMSO control.

RD cell culture was more sensitive to the cytotoxic effect of exometabolites of *Streptomyces* sp. Lim 10 – at all tested concentrations of exometabolites (from 2.5 to 500.0  $\mu\text{g/ml}$ ), the number of viable cells in the RD culture monolayer decreased to  $51.3 \pm 3.0 - 63.7 \pm 5.4\%$ , compared to the control DMSO.

In the metabolome of strain *Streptomyces* sp. Lim10, the only anticancer compound revealed was N- formylstaurosporine, and in the second - in addition to staurosporine itself, its derivatives: staurosporinone, 4'-demethylamino-4',5'-dihydroxystaurosporine, TAN 1030A 4'-De(hydroxyimino) 4'-oxo (or its 3'-epimer), and N13-glycosylated staurosporine derivative with an unidentified hydrocarbon radical (possibly  $\alpha$ -L-rhamnopyranose) (Fig. 6).

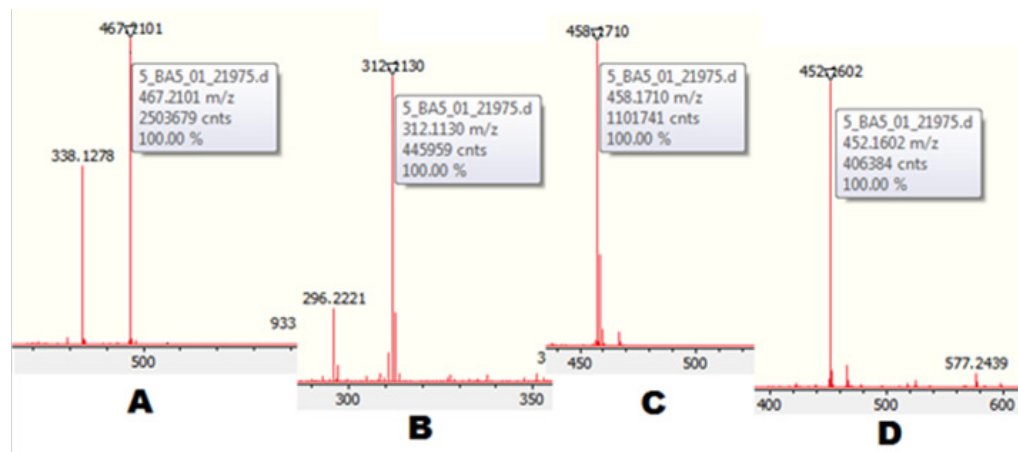


Hep-2 cell culture, control  
(with the DMSO at a concentration of 0.1%)



The influence of exometabolites of *Streptomyces* sp. Lim 10 at a concentration of 500.0  $\mu\text{g/ml}$  on Hep-2 cell culture

**Fig. 5. Morphological changes of cells and destruction of a monolayer of transplantable culture of Hep-2 human laryngeal adenocarcinoma cells under the influence of exometabolites of *Streptomyces* sp. Lim 10 in concentration 500.0  $\mu\text{g/ml}$ . Exposure 24 hours. (10x10, Zeiss AxioScope A1, Zeiss AxioCam 503; Zen 2.0)**



**Fig. 6. Chosen ESI-MS mass-spectra for staurosporine and its homologs in positive ionization mode: A – staurosporine (retention time – 6.6 min), B – staurosporinone (retention time – 8.11 min), C – staurosporine N13-  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (retention time 8.01 min); D – TAN 1030A 4'- de(hydroxyimino)**



These complex indolocarbazoles are powerful inhibitors of protein kinases and because of that, they have antitumor activity, stimulating malignant cells to apoptosis [10].

Most of the detected by LC-HRESIMS compounds (97 in positive mode and 134 in negative, respectively) were unidentified.

Thus, the results of our research indicate that the strain *Streptomyces* sp. Lim 10 is a promising producer of antitumor compounds and can be recommended for further more in-depth studies.

The Black Sea strain of actinobacteria *Streptomyces* sp. Lim 10, isolated from the fouling of shell rock, was characterized by high morphological variability, forming different colony morphotypes during growth.

Based on the study of biological properties of the Black Sea of actinobacteria strain Lim 10 can be attributed to the genus *Streptomyces*.

Cytotoxic activity of exometabolites of the marine strain *Streptomyces* sp. Lim 10 was established on the RD (rhabdomyosarcoma) and Hep-2 (laryngeal adenocarcinoma) culture models in concentrations from 250.0 to 500.0 µg/ml. Dose-dependent cytotoxic effect of the exometabolite was found in Hep-2 culture. RD culture was more sensitive to exometabolites of *Streptomyces* sp. Lim 10 – at concentrations of exometabolites from 2.5 to 500.0 µg/ml, the number of viable cells in the monolayer decreased by 1.5–2 times compared to the control.

The strain *Streptomyces* sp. Lim 10 is a promising producer of antitumor compounds and can be recommended for more in-depth further studies *in vivo*.

**Т.В. Гудзенко, І.В. Страшнова, О.Г. Горшкова,  
Г.В. Лісютін, М.Д. Штеніков, В.І. Сачковська**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
65058 вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна  
e-mail: tgudzenko@ukr.net

## МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ ЧОРНОМОРСЬКО- ГО ШТАМУ *STREPTOMYCES* SP. LIM 10

**Мета.** Метою роботи було вивчити морфологічні характеристики та цитотоксичну активність штаму актинобактерій *Streptomyces* sp. Lim 10 виділеного з природного обростання черепашику в Одеській затоці Чорного моря. **Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження був штаб морських актинобактерій *Streptomyces* sp. Lim 10. Морфологію та особливості росту вивчали на середовищах Гаузе 2, Чапека, Ешбі, TSB та на середовищах ІСП (ІСП-1–ІСП-7). Для накопичення вторинних метаболітів актинобактерій використовували середовище SG. Екстрагування екзометаболітів з культуральної рідини проводили етилацетатом з подальшим розчиненням у диметилсульфоксиді (ДМСО). Цитотоксичну активність екзометаболітів актинобактерій штаму *Streptomyces* sp. Lim 10 вивчали на моделі культур клітин людини – рабдоміосаркоми (RD) та аденокарциноми гортані (Hep-2). Цитотоксичну дію екзометаболітів актинобактерій штаму *Streptomyces*



*sp. Lim 10* визначали після 24 годин інкубації методом мікроскопії. Ступінь руйнування моношару оцінювали за кількістю життєздатних клітин за оптичною щільністю, яку вимірювали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 630 нм. Екзометаболіти актинобактерій штаму *Streptomyces sp. Lim 10* ідентифіковано за LC-ESIMS. **Результати.** Вивчення морфологічних властивостей чорноморського штаму актинобактерій *Streptomyces sp. Lim 10* показало, що для нього характерний плеоморфізм. Встановлено високу цитотоксичну активність екзометаболітів морського штаму актинобактерій *Streptomyces sp. Lim 10*. Рівень цитотоксичної дії метаболітів штаму актинобактерій *Streptomyces sp. Lim 10* на культуру клітин Нер-2 залежав від їх концентрації. Культура клітин RD була чутливішою до цитотоксичної дії екзометаболітів штаму *Streptomyces sp. Lim 10* – за всіх досліджених концентрацій екзометаболітів (від 2,5 до 500,0 мкг/мл) кількість життєздатних клітин у моношарі RD зменшувалася до  $51,3 \pm 3,0 - 63,7 \pm 5,4\%$ , порівняно з контролем. Це принаймні частково можна пояснити дією апоптоз-індукувального агенту стауроспорину, який продукується штамом *Streptomyces sp. Lim 10* разом із структурними гомологами. **Висновок.** Штам *Streptomyces sp. Lim 10* є перспективним продуцентом протипухлинних сполук і може бути рекомендований для подальших більш поглиблених досліджень.

*Ключові слова:* *Streptomyces*, Чорне море, морфологічні характеристики, екзометаболіти, цитотоксична активність.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білявська Л.О. Актинобактерії роду *Streptomyces* і їхні метаболіти у біорегуляції рослин: дис. док. біол. наук : 03.00.07. Київ. – 2018. – 485 с.
2. Галкін Б.М., Філіпова Т.О., Іваниця В.О., Гудзенко Т.В. Біоактивні вторинні метаболіти морських мікроорганізмів: монографія. – Одеса: ОНУ, 2022. – 220 с.
3. Потапенко К.С. Вторинні метаболіти морських актинобактерій з антибіотичною активністю // Мікробіологія і біотехнологія. – 2021. – № 3. – С. 28–43.
4. Abdel-Mageed W.M. Dermacosins, a new family of phenazines from deep-sea dermacocci isolated from the sediment of the Mariana Trench // Org. Biomol. Chem. – 2021. – № 8. – P. 2352–2362.
5. Abdelfattah M.S., Elmallah M.I.Y, Hawas U.W., El-Kassema L.T.A., Eid M. Isolation and characterization of marine-derived actinomycetes with cytotoxic activity from the Red Sea coast // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. – 2016. – V. 6 (8). – P. 651–657.
6. Buckingham J. Dictionary of natural products, supplement 4 // CRC press. – 1997. – V. 11.
7. Lewin G.R. Evolution and Ecology of *Actinobacteria* and their bioenergy applications // Microbiological Research. – 2016. – V. 70 (1). – P. 235–254.
8. Malve H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology // Journal of pharmacy bioallied sciences. – 2016. – V. 8. – P. 83–91.
9. Manivasagan P. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria // Microbiological Research. – 2014. – V. 169 (4). – P. 262–278.



10. *Omura S., Asami Y., Crump A.* Staurosporine: New lease of life for parent compound of today's novel and highly successful anti-cancer drugs // *The Journal of Antibiotics.* – 2018. – V. 71 (8). – P. 688–701.
11. *Paulus C., Rebets Y., Tokovenko B., Nadmid S., Terekhova L.P., Myronovskiy M., Zotchev S.B., Ruckert C., Braig S., Zahler S., Ralinovski J., Luzhetskyy A.* New natural products identified by combined genomics-metabolomics profiling of marine *Streptomyces* sp. MP131-18 // *Scientific Reports.* – 2017. – № 7. – P. 423–82.
12. *Purves K.* Using molecular networking for microbial secondary metabolite bioprospecting // *Metabolites.* – 2016. – V. 6 (1). – P. 133–121.
13. *Ramesh S.* Marine Rare *Actinomycetes*: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products // *Mar. Drugs.* – 2019. – V. 17. – 249 p.
14. *Wang Y.P.* Metabolite sensing and signaling in cell metabolism // *Signal Transduction and Targeted Therapy.* – 2018. – V. 3. – P. 30–41.
15. *Yang-Mei Z., Anandins A.* Two Rare Steroidal Alkaloids from a Marine *Streptomyces anandii* H41-59 // *Marine drugs.* – 2017. – V. 15 (11). – P. 355–369.
16. *Song Y., Huang H., Chen Y., Ding J., Zhang Y., Sun A., Zhang W., Ju J.* Cytotoxic and antibacterial marfuraquinocins from the deep South China Sea-derived *Streptomyces niveus* SCSIO 3406 // *J Nat Prod.*–2013. – V. 76 (12). – P. 2263–2268.

## REFERENCES

1. Belyavskaya LA. Actinobacteria of the genus *Streptomyces* and their metabolites in plant bioregulation: dis. ... doc. biol. sciences: 03.00.07. Kyiv. 2018: 485 (in Ukrainian).
2. Galkin BM, Filippova TO, Ivanytsia VO, Gudzenko TV. Bioactive secondary metabolites from marine microorganisms: monograph. Odesa. ONU. 2022: 220 (in Ukrainian).
3. Potapenko KS, Korotaeva NV, Ivanitsa VO. Secondary metabolites of marine actinobacteria with antibiotic activity. *Microbiology and biotechnology.* 2021; 3: 28–43 (in Ukrainian).
4. Abdel-Mageed WM. Dermacosins, a new family of phenazines from deep-sea dermacocci isolated from the sediment of the Mariana Trench. *Org. Biomol. Chem.* 2021; 8: 2352–2362.
5. Abdelfattah MS, Elmallah MIY, Hawas UW, El-Kassem LTA, Eid M. Isolation and characterization of marine-derived actinomycetes with cytotoxic activity from the Red Sea coast. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2016; 6 (8): 651–657.
6. Buckingham J. Dictionary of natural products, supplement 4. CRC press. 1997; 11.
7. Lewin GR. Evolution and Ecology of *Actinobacteria* and their bioenergy applications. *Microbiological Research.* 2016; 70 (1): 235–254.
8. Malve H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *Journal of pharmacy bioallied sciences.* 2016; 8: 83–91.





9. Manivasagan P. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*. 2014; 169 (4): 262–278.
10. Ōmura S, Asami Y, Crump A. Staurosporine: New lease of life for parent compound of today's novel and highly successful anti-cancer drugs. *The Journal of Antibiotics*. 2018; 71 (8): 688–701.
11. Paulus C, Rebets Y, Tokovenko B, Nadmid S, Terekhova LP, Myronovskiy M, Zotchev SB, Ruckert C, Braig S, Zahler S, Ralinovski J, Luzhetskyy A. New natural products identified by combined genomics-metabolomics profiling of marine *Streptomyces* sp. MP131-18. *Scientific Reports*. 2017; 7: 423–82.
12. Purves K. Using molecular networking formicrobial secondary metabolite bioprospecting. *Metabolites*. 2016; 6 (1): 133–121.
13. Ramesh S. Marine Rare *Actinomycetes*: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products. *Mar. Drugs*. 2019; 17: 249.
14. Wang YP. Metabolite sensing and signaling in cell metabolism. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2018; 3: 30–41.
15. Yang-Mei Z, Anandins A. Two Rare Steroidal Alkaloids from a Marine *Streptomyces anandii* H41-59. *Marine drugs*. 2017; 15 (11): 355–369.
16. Song Y, Huang H, Chen Y, Ding J, Zhang Y, Sun A, Zhang W, Ju J. Cytotoxic and antibacterial marfuraquinocins from the deep South China Sea-derived *Streptomyces niveus* SCSIO 3406. *J Nat Prod*. 2013; 76 (12): 2263–2268.

Стаття надійшла до редакції 01.09.2023 р.





**V.V. Subota, A.M. Ostapchuk, M.D. Shtenikov**

Odesa I. I. Mechnikov National University,  
2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine;  
e-mail: viktoriia27subota98@gmail.com

## DEEPENED GENOMICS-METABOLOMICS CHARACTERISTICS OF THE BACTERIA OF THE BACILLUS GENUS ISOLATED FROM DEEP-SEA

*Marine bacteria from the genus Bacillus are attracting increasing attention as a source of large amounts of bioactive metabolites. The biosynthetic potential of marine bacteria from the genus Bacillus is not sufficiently studied. The previous study of authors could not give a complete result, so it was decided to reanalyze the metabolites not identified at that time, taking into account the development of existing databases. Therefore, the work aimed to reanalyze the metabolome already performed on Bacillus velezensis ONU 553, Bacillus pumilus ONU 554, and Bacillus subtilis ONU 559 strains isolated from the Black Sea sediments. **Methods.** The general genome identification was performed using the online version of the Dictionary of Natural Products database, and search for biosynthetic clusters in genome of Bacillus velezensis ONU 553 - with antiSMASH 7.0. **Results and Conclusion.** Genomic-metabolic profiling of strains led to the identification of several new biological compounds – 7 and 1 metabolites in Bacillus velezensis ONU 553 and Bacillus pumilus ONU 554 strains, respectively, and to identify biosynthetic clusters of iturin- and helipeptin-like peptides in Bacillus velezensis ONU 553 strain for the first time. A new biosynthetic cluster was found in the Bacillus velezensis ONU 553 strain*

*Key words: Bacillus, Spergualin, Bacillomycin, Helipeptin, deepwater sediments.*

Until recently, soil microorganisms were the most productive sources of new antibiotics and anticancer compounds. However, the gradual decrease in the frequency of discovery of new biologically active compounds from representatives of this biotope pushes researchers to less studied ones. An example of such a biotope can be the sea, as an environment inhabited by life from the earliest times [8]. This study is aimed at deepening our knowledge of the biosynthetic potential of marine bacteria from the genus *Bacillus*.

It is known that the oceans occupy 70% of the world's surface, 95% of which have depths of more than 1000 m [2]. In the course of adaptation to conditions of high pressure, high salinity, lack of light and low oxygen concentration, metabolism, we can assume the formation of a special genetic pool of determinants of secondary metabolites, which distinguishes marine prokaryotes from their terrestrial relatives. This increases the probability of discovering structurally unique natural products in them.



Marine environments are already known as sources of strains with specific biosynthetic potential. For 50 years from 1948 to 1998 the number of new marine natural compounds exceeded 20 000, 2% of which were isolated from deepwater organisms [15]. However, due to the limitations of sample collection technologies, fewer microorganisms have been isolated from deep-sea environments than from coast and land.

Representatives of the genus *Bacillus* are promising for research to identify new metabolites. Examples of antibiotics produced by *Bacillus* spp include the lipopeptide bacitracin of *B. licheniformis* or *B. subtilis*, cyclic peptides polymyxin of *Paenibacillus polymyxa* and gramicidin of *Brevibacillus brevis*, as well as antibiotics of such groups as amicoumacins, polyketides and their derivatives [16]. In recent years, several lipopeptide antibiotics have received FDA approval for the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria, (e.g., daptomycin), and others are at various stages of clinical and preclinical trials [13]. *Bacillus* produces several of well-known examples of these compounds, including surfactins and fengycins. In addition to these better-known examples, these organisms generate a number of other classes of lipopeptides with potent antimicrobial activity.

Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. are secondary metabolites produced by non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) [3]. They usually contain amino acids of both L and D configurations, which leads to increased stability in the presence of proteolytic enzymes of target organisms, including human plasma proteases. This can potentially be used for patient treatment by oral administration and intravenous injection. The N-termini of lipopeptides of these species are usually acylated with branched-chain fatty acids, which often contain a  $\beta$ -hydroxyl functionality (usually in the R-configuration) [10]. In most, but not all cases, lipopeptides are cyclized by an ester or amide bond between a heteroatom on the side chain of an amino acid or lipid tail and the C-terminus, which limits the product's configurational flexibility. Nonproteinogenic amino acids are regularly incorporated into the peptide chain and provide additional diversity to this class of antibiotics. The mechanism of action of many lipopeptides involves membrane disruption, and due to the reorganization hurdle of membrane reorganization by target cells, relatively few resistant strains develop [3, 7].

This work aims to re-annotate the metabolite spectrum, of the genus *Bacillus* strains isolated from the Black Sea sediments. The metabolome obtained by author in 2018 [11] contains compounds that were not identified or had questionable identification due to the limitations of the database, and therefore it is of interest to reanalyze them, given the additions to the database in last years. Therefore, it was decided to re-annotate the metabolomes to supplement the knowledge about the biosynthetic potential of Black Sea bacteria from the genus *Bacillus*.

### Materials and methods

Previously studied strains of *Bacillus velezensis* ONU 553, *Bacillus pumilus* ONU 554 and *Bacillus subtilis* ONU 559 were used, which were at one time selected for their antagonistic activity from more than 240 strains of endospore-forming facultative anaerobic bacteria isolated from deep-sea sediments of the Black Sea [11].



Exometabolite spectra of the strains obtained in the course of work [11] were used as the main material for this study.

Reannotation was performed using the Dictionary of Natural Products database. The 2019 version of the program was used for identification of exometabolite components in work [11]. Currently, all unidentified or questionably identified compounds have been re-identified using the current online version.

The identification and analysis of biosynthetic clusters were performed using the antiSMASH 7.0 server. Comparison of the predicted product for biosynthetic clusters of NRPS was performed using the NORINE database [5].

## Results and discussion

In the exometabolomic data of *Bacillus velezensis* ONU 553, 7 metabolites were additionally identified, *Bacillus pumilus* ONU 554 – 1, and *Bacillus subtilis* ONU 559 – 0, respectively. The integrated data obtained during the analysis of the samples are presented in Table 1.

Previously, variants of the most studied class of non-ribosomal peptides, surfactins, were identified among the secondary metabolites of the studied strains [3, 11]. The newly found metabolites are presented in Table 1. From this result, we were interested in iturin-like peptides: Bacillopeptin and Bacillomycin.

Bacillomycin L<sub>c</sub>, a new antifungal antibiotic of the iturin class, was isolated from the *Bacillus subtilis* strain in a set of two structural analogs - Bacillomycin L<sub>c0</sub> and Bacillomycin L<sub>c4</sub>. The biosynthetic cluster of bacillomycin contains a set of A-domains with the following specificities: Asn, D-Tyr, D-Asn, Ser, Glu, D-Ser, Thr. It is known from a previous study [13] that a number of clusters were found in the genome of *Bacillus velezensis* ONU 553, but no such cluster was found to correspond to Bacillomycin at that time. Using antiSMASH, genome of ONU 553 was checked out and we found that the bacillomycin cluster was not separately represented in its output, and it was a cluster in the same region as fungycin (Table 2). The region of fungycin is 1.884.833 – 1,940.000, and the bacillomycin cluster with the region 1.965.000 – 2.021.950.

In the case of bacillomycin L<sub>c</sub>, the carboxylic acid is at position 1 (L-aspartic acid) and the amide is at position 5 (L-glutamine). Alternatively, the structure can be interpreted as a substitution of L-serine for L-proline in bacillomycin D [4].

Some *Bacillus* species can produce cyclic lipopeptides, and these lipopeptides are promising agents that contribute to the biocontrol of plant diseases. The cyclic lipopeptide plipastatin variant Bacillopeptin was isolated from the fermentation broth of *Bacillus amyloliquefaciens*, which originates from marine sediments.

In 1981, the water-soluble peptide Spergualin was isolated from the culture filtrate of *Brevibacillus laterisporus* and studied as a new anticancer or antibiotic substance [1].

Spergualin (1-amino-19-guanitido-11,15-dihydroxy-4,9,12-triazathiopri-non-adece-10,13-dione) has a synthetic derivative 15-deoxyspergualine. It's analog, 15-deoxyspergualine, later became widely known as a promising new immunosuppressant.

The exact mechanism of action of 15-deoxyspergualine is precisely unknown. It specifically binds to the heat shock protein Hsp 70 [1] and is believed to



Table 1  
**Compounds identified in *Bacillus velezensis* ONU 553 and *Bacillus pumilus* ONU 554 extracts**

Compounds identified in <i>Bacillus velezensis</i> ONU 553 extracts					
RT <sup>1</sup>	M <sup>2</sup> , Da	Name <sup>3</sup>	Accurate Mass <sup>4</sup> , Da	Biological Source <sup>5</sup>	Use / Importance <sup>5</sup>
5.08	1020.5174	Bacillomycin L <sub>C0</sub>	1020.516802	<i>Bacillus subtilis</i> FR-2	Displays good antifungal activity and cytotoxicity
5.39	1034.5333	Bacillopeptin B	1034.528426	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SH-B74	Inhibits several fungal pathogens in vitro
5.52	403.2969	Spergualin	403.2907027	<i>Bacillus laterosporus</i>	Unknown
5.71	1048.5489	Bacillomycin L <sub>C4</sub>	1048.54543	<i>Bacillus subtilis</i>	Displays good antifungal activity and cytotoxicity
6.33	1490.83	Agrastatin B	1490.831944	<i>Bacillus subtilis</i>	Inhibits several fungal pathogens in vitro
Compounds identified in <i>Bacillus pumilus</i> ONU 554 extracts					
7.71	241.2408	13-Methyltetradecanamide. Bacillamidin F	241.240564	<i>Bacillus pumilus</i>	Displays good antifungal activity and cytotoxicity

Note: 1 – release time of the compound in min; 2 – Molecular mass of compound, identified in this study; 3 – Name of identified compound; 4 – Molecular mass of identified compound according to the database (Dictionary of Natural Products, CRC Press); 5 – source and characteristics of identified compound according to the database.



Table 2

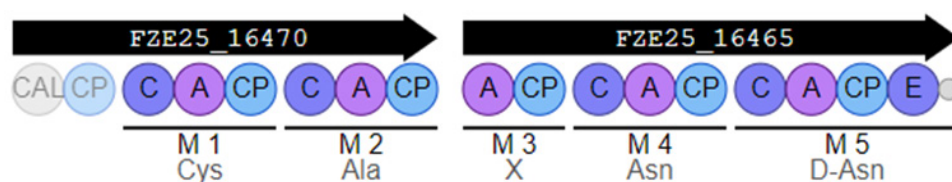
Characteristics and localization of clusters, found in the genome of *B. velezensis* ONU 553

No	Cluster	Localisation, bp		The most similar known cluster	Similarity, %
		From	To		
1	Nonribosomalpept idesynthetase	311.938	376.796	Surfactin	91
2	Polyketidesynthase	956.092	997.336	Butyrosin	7
3	Terpenoidsynthesi senzymes	1.084.807	1.101.975	–	–
4	Trans AT-polyketidesynthase	1.406.685	1.494.504	Macrolactine	100
5	Combined nonribosomal peptide synthetase /Trans AT-polyketidesynthase	1.717.970	1.827.173	Bacillaene	100
6	<b>NRPS/Trans AT-polyketidesynthase</b>	<b>1.884.833</b>	<b>1.940.000</b>	<b>Bacillomycin</b>	<b>100</b>
7	NRPS	1.965.000	2.021.950	Fengycin	100
8	Terpenoidsynthesi senzymes	2.044.982	2.066.865	–	–
9	Polyketidesynthase III type	2.117.302	2.158.402	–	–
10	Trans AT-tranferase	2.274.263	2.380.436	Difficidin	100
11	Bacteriocin	299924	300217	LCI	–
12	Bacteriocin	3052374	3049942	Amylocyclicin	–
13	Nonribosomalpept idesynthetase	3.003.787	3.054.939	Bacillibactin	100
14	Nonribosomalpept idesynthetase	3.337.057	3.397.053	–	–
15	Other	3.599.120	3.640.538	Bacilysin	100

have its main effect by inhibiting the activation of the transcription factor NFκB in antigen-presenting cells and monocytes [6].

The antibiotic Agrastatin was found in *B. subtilis* AQ713 and has a broad fungicidal spectrum *in vitro*. Agrastatin is a powerful tool for controlling the gray leaf rot of beans and geraniums, as well as the early blight of tomato seedlings caused by *Alternaria solani*. Downy mildew of grapes caused by *Plasmopara viticola* is also effectively controlled by Agrastatin, and its effectiveness in this regard is comparable to that of the synthetic fungicide metalaxyl [6].

Using the antiSMASH 7.0 program, an unidentified NRPS cluster was detected in the genome (Fig. 1). When analyzing this cluster using NORINE nonribosomal peptides database, the sequence of the A-domains was found to be similar to a metabolite from marine sponges, namely the antimicrobial peptide helipeptine.



**Fig.1. The domain structure of the products of the cluster NRPS from the genome of *Bacillus velezensis* ONU 553 identified by antiSMASH**

Bacillamidin F found in *Bacillus pumilus* ONU 554 is a hydrolysis product of an undetected amicoumacin. In a previous study [11], a cluster that may be responsible for the synthesis of amicoumacin AI-77A, as well as this amicoumacin itself, was already found in the strain under investigation.

As a result of the repeated metabolomic analysis, it was found that all studied strains of Black Sea bacteria of the genus *Bacillus* synthesize compounds whose structure fits into a small number of known structural categories. It should be noted that even though 4 years have passed since the last identification, there are still a number of compounds in the metabolomes that cannot be surely identified.

All the identified clusters of additional metabolites of the studied bacillus strains – Agrastatin, Bacillopeptin, Bacillomycin, and Spergualin, isolated from the Black Sea sediments, are interesting from a biological point of view and may be useful for future biotechnological research. A new biosynthetic cluster was found in the *Bacillus velezensis* ONU 553 strain, which was not known in this strain before – Bacillomycin. In the genome of *Bacillus velezensis* ONU 553 was detected a biosynthetic cluster of NRPS, whose product is similar to the metabolite of marine sponges, the antimicrobial peptide helipeptine. That together with the detection of unidentified biosynthetic clusters in the genome of ONU 553 indicates the prospects for the detection of previously unknown compounds.



**В.В. Субота, А.М. Остапчук, М.Д. Штеніков**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
65058 вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна,  
e-mail: viktoriiia27subota98@gmail.com

## ПОГЛИБЛЕНА ГЕНОМНО-МЕТАБОЛОМНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*, ВИДІЛЕНИХ З ГЛИБОКОВОДНИХ ВІДКЛАДЕНЬ ЧОРНОГО МОРЯ

### Реферат

Морські бактерії приваблюють все більше уваги як джерело великої кількості біоактивних метаболітів. Біосинтетичний потенціал морських бацил не є достатньо вивченим. Попереднє дослідження авторів не могло дати повного результату, тому було прийнято рішення провести переаналіз не ідентифікованих тоді метаболітів, з урахуванням доповнення існуючих баз даних. **Метою** роботи було провести переаналіз уже наявних метаболомних даних для штамів *Bacillus velezensis* ONU 553, *Bacillus pumilus* ONU 554, та *Bacillus subtilis* ONU 559, виділених із донних відкладень Чорного моря. **Методи.** Ідентифікацію сполук проводили за допомогою використання онлайн версії програми *Dictionary of Natural Products*, а пошук біосинтетичних кластерів у геномі *Bacillus velezensis* ONU 553 – з використанням *antiSMASH* 7.0. **Результати та висновки.** Геномно-метаболомне профілювання штамів призвело до ідентифікації декількох раніше не виявлених сполук – 7 та 1 метаболітів у штамів *Bacillus velezensis* ONU 553 та *Bacillus pumilus* ONU 554, відповідно. Виявлено раніше не виявлені біосинтетичні кластери – ітурин-подібних пептидів та геліпептид-подібних пептидів у *Bacillus velezensis* ONU 553.

*Ключові слова:* *Bacillus*, спергуалін, бациломіцин, геліпептин, глибоководні донні відкладення.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Banerjee T., Singh R.R., Gupta S., Surolia A., Surolia N. 15-deoxyspergualin hinders physical interaction between basic residues of transit peptide in PfENR and Hsp70-1 // *IUBMB. life.* – 2012. – V. 64 (1). – P. 99–107.
2. Childress J.J., Fisher C.R., The biology of hydrothermal vent animals: Physiology, biochemistry, and autotrophic symbioses // *Oceanograph. Mar. Biol.* – 1992. – V. 30. – P. 337–441
3. Cochrane S.A., Vederas J.C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Med Res Rev.* 2016; 36 (1); 4–31.
4. Eshita S.M, Roberto N.H., Beale J.M., Mamiya B.M., Workman R.F. Bacilomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners // *J Antibiot.* – 1995. – V. 48 (11) . – P. 1240–1247.
5. Flissi A., Ricart E., Campart C., Chevalier M., Dufresne Y., Michalik J., Jacques P., Flahaut C., Lisacek F., Leclère V., Pupin M. Norine: Update of the nonribosomal peptide resource // *Nucleic acids research.* – 2020. – V. 48 (1). – P. 465–469.



6. Halloran P.F. Molecular mechanisms of new immunosuppressants // Clin Transplant. – 1996. – V. 10 (1 Pt 2) . – P. 118–123.
7. Heisey R.M, Huang J., Mishra S.K., Keller J.E., Miller J.R., Putnam A.R., D’Silva T.D. Production of valinomycin, an insecticidal antibiotic, by *Streptomyces griseus* var. flexipertum var. Nov // J Agric Food Chem. – 1988. – V. 36. – P. 1283–1286.
8. Hughes C.C., Fenical W. Antibacterials from the sea // Chemistry–A European Journal. – 2010. – V. 16 (42) . – P. 12512–12525.
9. Morioka M., Kato K., Umezawa K. Design and synthesis of 15-deoxyspergualin–biotin conjugates as novel binding probes for target protein screening // The Journal of Antibiotics. – 2016. – V. 69 (7). – P. 574–578.
10. Murai A., Amino Y., Ando T. Absolute configuration of the beta-hydroxyl fatty acid constituent of permethin A // J Antibiot. – 1985. – V. 38 (11) . – P. 1610–1613.
11. Ostapchuk A.M., Shtenikov M.D., Ivanytsia V. O. Exometabolites of endospore-forming bacteria of *Bacillus* genus identified by genomic-metabolomic profiling // Ukrainian Biochemical Journal. – 2020. – V. 92 (6) . – P. 154–164.
12. Pirri G., Giuliani A., Nicoletto S.F., Pizzuto L., Rinaldi A.C. Lipopeptides as anti-infectives: A practical perspective // Cent. Eur. J. Biol. – 2009. – V. 4 (3). – P. 258–273.
13. Shtenikov M.D., Ostapchuk A.M., Vasyliieva N.Y., Luzhetskyy A.M., Rückert C., Kalinowski J., Ivanytsia, V.O. Characteristics of genome of *Bacillus velezensis* ONU 553 strain isolated from the bottom sediments of the Black Sea // MicrobiolBiotechnol. – 2020. – V. 82 (3) . – P. 14–21.
14. Schorlemmer H.U., Dickneite G., Seiler F.R. Treatment of acute rejection episodes and induction of tolerance in rat skin allotransplantation by 15-deoxyspergualin // Transplant Proc. – 1990. – V. 22. – P. 1626–1630.
15. Skropeta D. Deep-sea natural products // Natural Product Reports. – 2008. – V. 25 (6). – P. 1131–1166.
16. Tyurin A.P., Efimenko T.A., Prokhorenko I.A., Rogozhin E.A., Malanicheva I.A., Zenkova V.A., Efremenkova O.V., Korshun V.A. Chapter 12 - Amicoumamins and related compounds: chemistry and biology // Stud Nat Prod Chem. – 2018. – V. 55. – P. 385–441.
17. Valentin B.B., Vinod V., Beulah M.C. Biopotential of secondary metabolites isolated from marine sponge *Dendrilla nigra* // Asian Pac. J. Trop. Dis. – 2011. – V. 1. – P. 299–303.

## REFERENCES

1. Banerjee T, Singh RR, Gupta S, Surolia A, Surolia N. 15-deoxyspergualin hinders physical interaction between basic residues of transit peptide in PfENR and Hsp70-1. *IUBMB life*. 2012; 64(1): 99–107.
2. Childress JJ, Fisher CR. The biology of hydrothermal vent animals: Physiology, biochemistry, and autotrophic symbioses. *Oceanograph. Mar. Biol.* 1992; 30: 337–441
3. Cochrane SA, Vederas JC. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Med Res Rev*. 2016; 36(1): 4–31.



4. Eshita SM, Roberto NH, Beale JM, Mamiya BM, Workman RF. Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *J Antibiot.* 1995; 48(11): 1240–1247.
5. Flissi A, Ricart E, Campart C, Chevalier M, Dufresne Y, Michalik J, Jacques P, Flahaut C, Lisacek F, Leclère V, Pupin M. Norine: Update of the nonribosomal peptide resource. *Nucleic acids research.* 2020; 48(1): 465–469.
6. Halloran PF. Molecular mechanisms of new immunosuppressants. *Clin Transplant.* 1996; 10(1 Pt 2): 118–123.
7. Heisey RM, Huang J, Mishra SK, Keller JE, Miller JR, Putnam AR, D'Silva TD. Production of valinomycin, an insecticidal antibiotic, by *Streptomyces griseus* var. flexipertum var. nov. *J Agric Food Chem.* 1988; 36: 1283–1286.
8. Hughes CC, Fenical W. Antibacterials from the sea. *Chemistry—A European Journal.* 2010; 16(42): 12512–12525.
9. Morioka M, Kato K, Umezawa K. Design and synthesis of 15-deoxyspergualin–biotin conjugates as novel binding probes for target protein screening. *The Journal of Antibiotics.* 2016; 69(7): 574–578.
10. Murai A, Amino Y, Ando T. Absolute configuration of the beta-hydroxyl fatty acid constituent of permetin A. *J Antibiot.* 1985; 38(11): 1610–1613.
11. Ostapchuk AM, Shtenikov MD, Ivanytsia VO. Exometabolites of endospore-forming bacteria of *Bacillus* genus identified by genomic-metabolomic profiling. *Ukrainian Biochemical Journal.* 2020; 92(6): 154–164.
12. Pirri G, Giuliani A, Nicoletto SF, Pizzuto L, Rinaldi AC. Lipopeptides as anti-infectives: A practical perspective. *Cent Eur J Biol.* 2009; 4(3): 258–273.
13. Shtenikov MD, Ostapchuk AM, Vasylieva NY, Luzhetskyy AM, Rückert C, Kalinowski J, Ivanytsia VO. Characteristics of genome of *Bacillus velezensis* ONU 553 strain isolated from the bottom sediments of the Black Sea. *MicrobiolBiotechnol.* 2020; 82(3): 14–21.
14. Schorlemmer HU, Dickneite G, Seiler FR. Treatment of acute rejection episodes and induction of tolerance in rat skin allotransplantation by 15-deoxyspergualin. *Transplant Proc.* 1990; 22: 1626–1630.
15. Skropeta D. Deep-sea natural products. *Natural Product Reports.* 2008; 25(6): 1131–1166.
16. Tyurin AP, Efimenko TA, Prokhorenko IA, Rogozhin EA, Malanicheva IA, Zenkova VA, Efremenkova OV, Korshun VA. Chapter 12 - Amicoumacins and related compounds: chemistry and biology. *Stud Nat Prod Chem.* 2018; 55: 385–441.
17. Valentin BB, Vinod V, Beulah MC. Biopotential of secondary metabolites isolated from marine sponge *Dendrilla nigra*. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2011; 1: 299–303.

Стаття надійшла до редакції 07.09.2023 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*. – 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 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., Наталіч 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 27.09.2023 р. Формат 70x100/16.  
Ум.-друк. арк. 5,28. Наклад 20 пр.  
Зам. № 2662.

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