

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал
Виходить 4 рази на рік
Засновано у липні 2006 року

№ 3(43)
2018

Одеса
ОНУ
2018

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 (Дніпропетровськ, Україна), Р. А. Волков (Чернівці, Україна), Б. М. Галкін (Одеса, Україна), А. Гаміан (Вроцлав, Польща), П. І. Гвоздяк (Київ, Україна), Т. Ертле (Нант, Франція), Г. О. Іутинська (Київ, Україна), Л. В. Капрельянц (Одеса, Україна), Н. К. Коваленко (Київ, Україна), І. К. Курдиш (Київ, Україна), Б. П. Мацелюх (Київ, Україна), І. П. Метеліцина (Одеса, Україна), Ф. Моцці (Тукуман, Аргентина), В. П. Пагика (Київ, Україна), Петров С. А. (Одеса, Україна), В. С. Підгорський (Київ, Україна), А. А. Сибірний (Львів, Україна), Л. М. Сківка (Київ, Україна), М. Я. Співак (Київ, Україна), І. А. Тихонович (Санкт-Петербург, Росія), Ф. І. Товчач (Київ, Україна), В. О. Федоренко (Київ, Україна), Н. Чанішвілі (Тбілісі, Грузія), С. В. Чеботар (Одеса, Україна)

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

Постановою Президії ВАК від 27.05.2009 № 1-05/2 журнал внесено до переліку наукових фахових видань України

Реферативна база 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), Українські наукові журнали (usj.org.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Reseach Bib, Наукова електронна бібліотека e-LIBRARY, IBI Factor

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

© Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова, 2018

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

EDITOR-IN-CHIEF

V. O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T. O. Filipova (Odesa, Ukraine)

EXECUTIVE SECRETARY

T. V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

EDITORIAL BOARD MEMBERS

A. Anadon (Madrid, Espana), N. Chanishvili (Tbilisi, Geordgia), S. V. Chebotar (Odesa, Ukraine),
V. O. Fedorenko (Kyiv, Ukraine), B. M. Galkin (Odesa, Ukraine), A. Gamian (Wroclaw, Poland),
P. I. Gvozdyak (Kyiv, Ukraine), T. Haertle (Nantes, France), G. O. Iutynska (Kyiv, Ukraine),
L. V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), N. K. Kovalenko (Kyiv, Ukraine), I. K. Kurdish (Kyiv, Ukraine),
B. P. Matselyukh (Kyiv, Ukraine), I. P. Metelitsyna (Odesa, Ukraine), F. Mozzi (Tucuman, Argentina),
V. P. Patyka (Kyiv, Ukraine), Petrov S. A. (Odesa, Ukraine), V. S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine),
M. Ya. Spivak (Kyiv, Ukraine), A. A. Sybirny (Lviv, Ukraine), L. M. Skivka (Kyiv, Ukraine),
I. A. Tykhonovych (St.-Peterburg, Russia), F. I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L. D. Varbanets (Kyiv, Ukraine),
A. I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine), R. A. Volkov (Chernivtsi, Ukraine)

Scientific editor V. O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

**The journal was included to the list of Ukrainian scientific editions by the
Presidium of High Attestation Commission (№ 1-05 /2 from 27.05.2009)**

**Bibliographic Database «Ukrainika scientific», Index Copernicus Journals Master List,
Scientific Periodicals in National Library of Ukraine Vernadsky, Ulrich's periodicals,
Scientific Periodicals of Ukrain (journal.uran.ua), Ukrainian Scientific journals (usj.org.
ua), Institutional Repository at Odesa I. I. Mechnykov National University, Google Scholar,
Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Reseach Bib, e-LIBRARY, IBI Factor**

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

Editors: L. B. Kotlyarova, I. V. Raiko

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

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

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

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

© Odesa National Mechnykov
University, 2018

ЗМІСТ

ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

Т. В. Іваниця, І. В. Страшнова, Д. С. Смальчук ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ РОДУ <i>PANTOEA</i>	6
---	---

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

С. Л. Голембіовська, Т. В. Дворник, Л. В. Поліщук, Б. П. Мацелюх МІНЛИВІСТЬ КАРОТИНСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ШТАМІВ <i>STREPTOMYCES GLOBISPORUS</i> 1912 ПІСЛЯ ГЛИБИННОГО ВИРОЩУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ	26
---	----

Н. В. Ліманська, Н. В. Соколова, А. А. Судак, М. Б. Галкін, В. О. Іваниця ВПЛИВ <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> НА РІСТ ПШЕНИЦІ НА ГІДРОПОНЦІ ТА У ҐРУНТІ	36
---	----

Т. В. Іваниця, І. В. Страшнова ЧИСЕЛЬНІСТЬ І БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i> , ВИДІЛЕНИХ З РІЗНИХ СОРТІВ ВИНОГРАДУ ОДЕСЬКОЇ ОБЛАСТІ	50
---	----

Елена Какабадзе,, Ната Бакурадзе, Ніно Грдзелишвілі, Хатуна Макалатія, Гульнара Натрошвілі, Ніна Чанішвілі МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ КАВКАЗЬКОГО ПРОДУКТУ МАЦОНИ	65
---	----

А. Г. Мерліч, Н. В. Коротаєва СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ БАКТЕРІЙ ШТАМУ <i>ENTEROCOCCUS ITALICUS</i> ОНУ547	75
---	----

М. Д. Штеніков, А. М. Остапчук, В. О. Іваниця АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ СПОРОУТВОРЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ ГЛИБОКОВОДНИХ ВІДКЛАДЕНЬ ЧОРНОГО МОРЯ	82
--	----

ЮВІЛЕЇ І ДАТИ

АКАДЕМІК СЕРГІЙ ВАСИЛЬОВИЧ КОМІСАРЕНКО – ЗАСНОВНИК МОЛЕКУЛЯРНОЇ ІМУНОЛОГІЇ В УКРАЇНІ, ВІДОМИЙ ДЕРЖАВНИЙ І ГРОМАДСЬКИЙ ДІЯЧ (До 75-річчя від дня народження)	90
--	----

ХРОНІКА НАУКОВОГО ЖИТТЯ

XIII МІЖНАРОДНА ЛІТНЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦІЯ «МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» ЗА ТЕМАТИЧНИМ НАПРЯМОМ «БІОІНФОРМАТИКА»	112
--	-----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	116
--	-----

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

T. V. Ivanytsia, I. V. Strashnova, D. S. Smalchuk CHARACTERISTICS OF BACTERIAL GENUS <i>PANTOEA</i>	6
---	---

EXPERIMENTAL WORKS

S. L. Golembiovska, T. V. Dvornyc, L. V. Polishchuk, B. P. Matselykh VARIABILITY OF CAROTENOID-SYNTHETIC STRAINS <i>STREPTOMYCES</i> <i>GLOBISPORUS</i> 1912 AFTER DEEP CULTIVATION AND STORAGE	26
--	----

N. V. Limanska, N. V. Sokolova, A. A. Sudak, M. B. Galkin, V. O. Ivanytsia EFFECT OF <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ON GROWTH CHARACTERISTICS OF WHEAT IN HYDROPONICS AND SOIL	36
---	----

T. V. Ivanytsia, I. V. Strashnova QUANTITY AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE BACTERIUM <i>PANTOEA</i> <i>AGGLOMERANS</i> ISOLATED FROM DIFERENT GRAPE VARIETIES IN ODESA REGION	50
--	----

Elene Kakabadze, Nata Bakuradze, Nino Grdzlishvili, Khatuna Makalatia, Gulnara Natroshvili, Nina Chanishvili MICROBIOLOGICAL INVESTIGATION OF ARTISANAL CAUCASIAN YOGURT-LIKE PRODUCT MATSONI	65
--	----

A. G. Merlich, N. V. Korotaieva FATTY ACID COMPOSITION OF BACTERIA OF <i>ENTEROCOCCUS ITALICUS</i> ONU547 STRAIN	75
---	----

M. D. Shtenikov, A. M. Ostapchuk, V. O. Ivanytsia ANTAGONISTIC ACTIVITY OF ENDOSPOREFORMING BACTERIA OF DEEP WATER THE BLACK SEA SEDIMENTS	82
---	----

ЮБІЛЕЇ І ДАТИ

ACADEMICIAN SERGEI VASYLOVYCH KOMISARENKO – THE FOUNDER OF MOLECULAR IMMUNOLOGY IN UKRAINE, THE STATE AND PUBLIC PARTICIPANT (<i>75-th Anniversary of birth</i>)	90
--	----

SCIENTIFIC LIFE CHRONICLES

XIII INTERNATIONAL SUMMER SCHOOL - CONFERENCE "MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY" ON THE THEMATICAL DIRECTION "BIOINFORMATICS"	112
---	-----

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	116
------------------------------------	-----

ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3\(43\).142584](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3(43).142584)

УДК 579.2

Т. В. Іваниця, І. В. Страшнова, Д. С. Смальчук

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38(048) 746 61 02, e-mail: t.ivanytsia@gmail.com

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ РОДУ *PANTOEA*

*В огляді представлені дані сучасних джерел літератури про бактерії роду *Pantoea*. Наведено загальні культуральні, біохімічні та морфологічні властивості бактерій даного роду. Детально розглянуто геном та генетичні елементи, їх вплив на ріст та поведінку мікроорганізмів. Також описана асоціація бактерій цього роду з *Daktulosphaera vitifoliae* – шкідником винограду, та розглянуто можливий вплив бактерій на виноградну філоксеру. Освітлено ендofітні та епіфітні властивості та особливості представлених видів. Розглянуто патогенні властивості та особливості виділення бактерій роду *Pantoea agglomerans*. Наведені приклади практичного використання даних бактерій.*

*Ключові слова: бактерії роду *Pantoea*, виноградна лоза, *Daktulosphaera vitifoliae*.*

Рід *Pantoea* включає багато видів бактерій, які можуть бути ізольовані з різноманітних джерел. Він був виокремлений в окремий рід відносно недавно, на цей час ідентифіковано близько 20 видів бактерій цього виду, які мають різні характеристики [16].

Рід *Pantoea* представляє собою групу жовто-пігментованих, паличкоподібних грамнегативних бактерій у родині *Enterobacteriaceae*. Деякі з перших ізолятів були визнані патогенами рослин, тому що здатні викликати галли, зів'янення, м'яку гниль і некроз у різних сільськогосподарських рослин [30].

У зв'язку з глобальною зміною клімату виноградарство на сьогоднішній день стикається з серйозною проблемою хвороб виноградної лози, що призводить до використання різних хімічних засобів боротьби з збудниками хвороб рослин. Це викликає ріст споживчого попиту на екологічно чисте виноградарство. За останні два десятиліття захворювання винограду, які поширюються по всьому світу, і мікробіологічний склад виноградної лози стали предметом серйозного занепокоєння серед виноградарів та вчених [14].

Увагу вчених привертали раніше головним чином мікроміцети та

© Т. В. Іваниця, І. В. Страшнова, Д. С. Смальчук, 2018



методи боротьби з ними, але боротьба з грибковими захворюваннями не знімає проблему захворювання винограду. Рід *Pantoea* є другим за чисельністю родом бактерій виділених з винограду. Найчастіше виділені штами є епіфітами або ендоефітами, але особливості даних видів вивчені недостатньо. Останнім часом, стало відомо, що бактерії роду *Pantoea* асоційовані з виноградною філоксерою, яка призводить колосальних збитків виноградарству по всьому світу [8].

Вивчення бактерій, що населяють виноградні лози є актуальним і донині, бо відкриває можливості розробки методів лікування рослин і розробки біоконтрольних агентів. Тому дослідження роду *Pantoea*, а також його повний і докладний опис є важливим.

Систематичне положення бактерій роду *Pantoea* та їх фізіолого-біохімічні властивості

Систематичне положення, згідно 10 видання визначника Бергі, виглядає таким чином:

Домен *Bacteria*

Відділ *Proteobacteria*

Клас *Gammaproteobacteria*

Ряд Порядок *Enterobacteriales*

Родина *Enterobacteriaceae*

Рід *Pantoea*

Оптимальна температура росту для бактерій роду *Pantoea* 28–30 °С. Культивування і ріст при температурах, вищих за оптимальні, призводять до утворення непігментованих колоній. Біовари, у яких була відсутня пігментація, в цілому мають низьке виживання порівняно з диким типом в присутності H_2O_2 на поживних речовинах. Біохімічний аналіз цих варіантів показав втрату здатності синтезувати основний кофактор тіаміну і неможливість використання вуглеводних джерел. Зазвичай колонії погано ростуть на живильному агарі [22]. Але при додаванні нікотинової кислоти до середовища починають краще рости. Колонії на живильному агарі гладкі, напівпрозорі і опуклі, з цільними краями [31].

Бактерії не утворюють капсул і спор, тест на оксидазу негативний. Здатність рости на середовищі Сімонса з цитратом, свідчить про те, що бактерії використовують цитрат як єдине джерело вуглецю. Більшість штамів стійкі до солей ціаністої кислоти, також ростуть на середовищі Лурія-Бертані. Більшість ізолятів *P. agglomerans* продукують жовтий пігмент на триптичному соєвому бульйоні [22].

Представники роду *Pantoea* – широко розповсюджені хемоорганотрофні грамнегативні бактерії з високою генетичною здатністю до адаптації. Всі бактерії цього роду факультативні анаероби, прямі палички розміром 0,5–1,0 x 1–3 мкм, і оптимальною температурою росту від 28 до 30 °С. Перетрихціальні джгутики, розташовані по всій поверхні клітинної стінки, забезпечують рухливість бактерій. Бактерії також можуть синтезувати ендотоксин, який є гетерополімерною макромолекулою, яка знаходиться в зовнішній частині клітинної стінки грамнегативних бактерій. Ендотоксин бактерій



роду *Pantoea* являє собою везикулярні наночастинки з ліпополіцукриду [17,2]. Везикули ендотоксину мають сильніші біологічні ефекти, ніж очищені ліпополіцукриди. Молекула ендотоксину складається з трьох областей: ліпіда А (що володіє високою біологічною активністю), олігоцукрида кору і О-специфічних поліцукридів (що володіють антигенними властивостями) [1,2].

Більшість бактерій роду *Pantoea* мають унікальну властивість утворювати свого роду багатоклітинні структури, які формуються окремими клітинами, тісно пов'язаними одна з одною, оточені екзополіцукридною оболонкою, так звані «сімплазмати». Екологічна роль і еволюційний початок утворення сімплазматів в бактеріях *Pantoea* залишаються неясним. Для рослин, які колонізуються штамами *P. agglomerans*, сімплазмати були безпосередньо виявлені на поверхнях коренів і листя, а також в рослинних тканинах [11]. Вони забезпечують стресостійкість і сприяють адаптації під час взаємодії бактерії з рослиною. У сімплазматах клітини щільно агрегують і покриваються позаклітинними білками і, отже, демонструють відносно низьку швидкість метаболізму, це дозволяє клітинам бути менш сприйнятливими до деформації під тиском і більш стійкими до несприятливих умов, викликаних слабким трансмембранним транспортом. Сімплазмати стійкі до дії протеїнази К та до забарвлення ліпофільним флуоресцентним барвником [24]. У рідкому середовищі їх утворення залежить від фази росту культури. Бактерії у сімплазматах проявляють різну рухливість на поверхні твердого середовища, це залежить від різних умов «харчування», вологості і вмісту води. Спостерігалось майже повне припинення утворення сімплазмат при рН середовища 7,8 і, наприклад, при наявності фруктози в середовищі це призводить до зниження концентрації утворення сімплазмат [18]. Додавання казамінових кислот (гідролізат казеїну) до середовища також призводить до значного зниження їх кількості, а в багатому середовищі та при температурі 37 °С сімплазмати взагалі не утворюються [16].

Доведено, що D-тирозин сприяє утворенню сімплазмат і збільшує бактеріальну рухливість, не впливаючи при цьому на ріст бактерій. Також при додаванні D-тироzinу, експресія білків зменшується, що перешкоджає трансмембранному переносу йонів і поживних речовин, приводячи до порушення гомеостазу клітин [21]. Кожна сімплазмата містить від декількох до сотень бактеріальних клітин всередині загальної капсули товщиною до 20 мікрометрів. Капсульний матеріал складається з глікокон'югата, що містить цукор (в першу чергу рамнозу, глюкозу і галактозу), уронові кислоти, гліцерин і інозит. Інкубація з метаперіодатом, хімічною речовиною, яка розщеплює поліцукриди, видаляє капсулу, але не виділяє клітини з кластерів. Клітини всередині залишаються чутливими до стимуляції хімічними сигналами з навколишнього середовища, і вони здатні реплікуватися після виділення з кластера [24]. Ген *lghA* кодує регуляторний білок LysR-типу *LghA*, який зберігається серед представників родини *Enterobacteriaceae* як транскрипційний репресор *flhDC*, який кодує головний ген-регулятор (джгутіка) рухливості і хемотаксису. Введення транспозонів в гени зменшували або змінювали подальше утворення, але не зупиняли формування сімплазмат. Багато з генів бактеріальних клітин, які знаходяться у сімплазматах кодують структурні або регуляторні білки, які



беруть участь в поглинанні або деградації вуглецевих субстратів, включаючи галактозу (mglB, mglA, mglD), піранозу (ytfQ), рамнозу (rhaT, rhaS), арабінозу (araC), рибозу (rbsK), мальтозу (malE), глюкуронати / галактонат (uxuA), 3-фосфат гліцерин (glpT), гліцерин (glpF), інозит (iolD, iolI) і жирні кислоти (fadL, fadI, fadD) [24].

Існує припущення, що поділ клітин на ранніх стадіях утворення сімплазмат відбувається синхронно. Починаючи з 8-клітинної стадії, ця синхронізація зникає і починає виглядати більш нерівномірною, що спостерігається в зрілих сімплазматах. Ця особливість сімплазмат відома як «genets», тобто групи генетично ідентичних індивідуумів, що ростуть разом і походять від одного пращура. Сімплазмат, які утворюються у *Pantoea*, є важливим видом структур для бактеріальної адаптації, виживання і асоціації з господарем [22].

Представники цього роду мають дихальний і бродильний тип метаболізму. Реакція Фогеса-Проскауера позитивна, і це свідчить про те, що бактерії викликають бутанолове бродіння глюкози, в процесі чого утворюється діацетил, попередниками якого є ацетоїн -2,3-бутандіол [24].

Представники *Pantoea* катаболізують D-глюкозу та інші вуглеводи (D-фруктозу, D-галактозу, трегалозу, D-маннозу, целобіозу) з утворенням кислоти, але не газу. Проба з метиловим червоним варіює. Кислоту отримують шляхом ферментації L-арабінози, D-рибози, D-ксилози, D-галактози, D-фруктози, L-рамнози, D-манітола, N-ацетилглюкозаміна, мальтози і трегалози. За здатністю використовувати малонат види розрізняються [12].

По лізиндекарбоксилазі, орнітиндекарбоксилазі й аргініндегідролазі негативні. Здатні синтезувати фермент глюкозодегідрогеназу. Бактерії не здатні деградувати пектат [12]. *P. agglomerans* єдиний вид, що здатен використовувати D-тартрат як джерело вуглецю. По уреазі негативні, тобто не мають ферментів для гідролізу сечовини. Бактерії роду *Pantoea* гідролізують желатин, що свідчить про наявність протеолітичної активності. Види *Pantoea* можуть окиснювати глюкозу до глюконату [31].

Всі штами *P. agglomerans* однаково чутливі до аміноглікозидів, наприклад, до гентаміцину, тобраміцину, амікацину. Вони також чутливі до фторхінолонів, які порушують синтез ДНК бактеріальних клітин, а саме до офлоксацину та ципрофлоксацину. Всі бактерії повністю чутливі до цефалоспоринів широкого спектру дії, які пригнічують синтез пептидогліканового шару. У бактерій роду *Pantoea* зустрічається шікіматний шлях, який проходить через 2-аміно-4-дезоксихоризмат, результатом подальших метаболічних перетворень цієї сполуки у бактерій є утворення пігментів і антибіотиків феназинового ряду. Чутливість до β -лактамів може варіювати.

Ретельне обстеження шляхів метаболізму жирних кислот визначило здатність виконувати β -окиснення жирних кислот [26]. Також передбачається, що вони здатні продукувати поліаміновий спермідин [28]. Відомо що, бактерії цього виду здатні перетворювати екологічний хлорацетальдегід в гліколят, тим самим забезпечуючи подвійний засіб утилізації мутагена і доступ до гліколятів як джерела вуглецю [31].

Типовий вид даного роду виявляє унікальну активність до утворення льодяних ядер, які ініціюють формування кристалів льоду на поверхні рос-



лин, що призводить до їх пошкодження від замерзання при температурах, за яких зазвичай пошкодження не трапляється. Вони містять ген нуклеації льоду *inaA*, трохи схожий на *inaW* і *inaZ* гени *Pseudomonas syringae* і *P. fluorescens*. Ці структури надходять з зовнішньої мембрани бактерії у формі везикул, із білками всередині, розміром 50–300 нм [18].

У сукупності ці дані демонструють, що еволюція забезпечила бактерії роду *Pantoea* різноманітними метаболічними процесами, які роблять їх в цілому більш універсальними у своїй здатності адаптуватися до умов, що змінюються. Вони можуть використовувати більш широкий спектр джерел вуглецю і ефективніше використовувати наявні ресурси, переробляючи побічні продукти метаболізму. Це потенційно також дає їм конкурентну перевагу в умовах відсутності поживних речовин [26].

Геном та гени патогенності

Секвенування геному бактерій роду *Pantoea*, сприяло кращому розумінню колонізувальних і метаболічних властивостей рослин-господарів. Найбільш поширеними причинами, які сприяють генетичній зміні, є випадкові мутації (точкові мутації, а також вставки і делеції) і горизонтальний перенос генів [28].

Хоча на даний момент не було широкомасштабного систематичного порівняльного або еволюційного геномного аналізу бактерій роду *Pantoea*, деякі загальні геномні ознаки, ідентифіковані в більш конкретних аналізах, включають ацил-гомосерин лактони та інші гени кворум сенсінгу, гени, що сприяють росту рослин, гени репарації ДНК, патогенні чинники, а також системи секреції типу III, IV і VI. Вміст G + C пар в ДНК становить від 52,7 до 60,6% [11]. Однією з функцій, нещодавно ідентифікованої для системи секреції 6 типу (T6 SS) різних бактеріальних таксонів, є секреція антимікробних ефекторів, яка передбачає роль у зв'язку з антибіотиком і в міжбактеріальній конкуренції [13].

Гени, що кодують білки, які визначають патогенність і інші ознаки видів роду часто розташовані в плазмідах. Спільним для всіх видів бактерій роду *Pantoea* є наявність гена, виявленого на плазмідах, *gerA*. У виді *P. agglomerans* були ідентифіковані плазміди родини *Large Pantoea Plasmids* (LPP) [25]. Зараз відомо, що ця плазміда спільна для всіх видів. Локуси, які кодуються плазмідною, пов'язані з метаболізмом і транспортуванням різних цукрів, вуглеводів, амінокислот і органічних кислот, а також асиміляцією неорганічних йонів, заліза і азоту, стійкістю до антибіотиків і важких металів, колонізації господаря, патогенезу. Плазмідні послідовності LPP мають розмір від 281 до 794 kb, вносять свій внесок між 5,6% і 12,6% від загального вмісту генома, зміст G + C 53,90%, і містять від 238 до 750 послідовностей, що кодують білок, які необхідні для біосинтезу тіаміну. Було показано, що штами, позбавлені цієї плазміди, потребують тіамін для подальшого зростання. Гени *thiOSGF*, необхідні для біосинтезу основного кофактора тіаміну. LPP кодує велику кількість білків, які зіграли важливу роль в адаптації різних видів бактерій роду *Pantoea*. У плазміді міститься ген *crtEYIBZ*, його продукти беруть участь у продукції каротиноїдного пігменту – зеаксантину. Він захищає мі-



кроорганізми від ультрафіолетового опромінення [23].

Додатковий ген *crtX* додає диглюкозидну групу до пігменту. Локус *ascBFG* бере участь в транспорті і катаболізмі арбутину, саліцину і целобіози. Є локус, відповідальний за транспорт і катаболізм мальтози та мальтодекстрину. Інші локуси пов'язані з транспортом і метаболізмом, включаючи ті, які використовуються для синтезу галактану (*ganKEFGABCLR*). Показано, що позбавлені плазмідні бактерії не здатні ефективно використовувати ряд вуглеводних, аміно- і органічних кислотних субстратів, що вказує на роль плазмід в метаболічній універсальності цього організму. Наявність генів для адгезивних структур на LPP передбачає, що ця плазміда грає роль в прикріпленні і збереженні бактерій роду *Pantoea* в різних екологічних нішах, які вони займають, включаючи потенційних господарів рослин і комах [25].

Більшість штамів *P. agglomerans* містять також плазмідну рРАGA, з послідовністю 2734 пар нуклеотидів. Ця плазміда кодує біосинтез антимікробного пептиду гербіколіну. Вона має унікальний сайт EcoR1, який зараз використовується для вставки плазмід у вектор і отримання генномодифікованих ендоефітів [6]. У більшості штамів *P. agglomerans* була знайдена загадкова плазміда рРА3.0. Втрата цієї плазмідної не приводить до фенотипових відмінностей у розвитку колоній. Аналіз сайту рестрикції показав у неї наявність трьох сайтів рестрикції для PstI і один сайт для кожної ендонуклеази PvuII, HincII, BglIII, XbaI і BamHI. Повна плазмідна послідовність рРА3.0 складалася з 2901 нуклеотидів з вмістом G+C 45,19%.

Наявність плазмід у цих бактеріях грає ключову роль в адаптації до нових екологічних ніш і розвитку їх як патогенів, так і як симбіонтів, промоторів росту рослин, сапрофітів, агентів біоконтролю [31]. Але така широка адаптивна ніша значно впливає на кількість корисних алелів і, ймовірно, призводить до збільшення частоти появи шкідливих алелів в геномі. Плазміда рРАТН пов'язана з вірулентністю *P. agglomerans* для рослин, штамів відрізняються за наявністю цієї плазмідної. Щоб визначити наявність або відсутність плазмідної рРАТН серед штамів, проводять ПЛР-аналіз, який націлений на ген *gerA*, який кодує білок реплікації плазмідної рРАТН. Ця плазміда кодує систему секреції III типу, а також ферменти для синтезу індоліл-оцтової кислоти, які дають здатність цим патогенам інфікувати і індукувати пухлиногенез у рослин [6].

Бактеріофаги є потужним фактором мінливості бактерій. Вони мало досліджені. На даний момент відомими є бактеріофаги *LIMEzero* і *LIMElight* у *P. agglomerans*. Це літичні фаги, які мають дволанцюгові ДНК геноми (43 032 кб і 44 546 кб,) кодуєть 57 і 55 відкритих рамок зчитування, мають власну РНК-полімеразу [5]. На відміну від «Т7-подібних вірусів», ці фаги залежать від РНК-полімерази господаря для транскрипції генів. За рахунок цього їх необхідно відносити в підродину *Autographivirinae* до роду «phiKMV-подібних вірусів». Вміст G+C пар у бактеріофага *LIMElight* і *LIMEzero* становить 54,0% і 55,4%. Віріон представляє собою частку з ікосаедричним капсидом діаметром 60 нм, коротким хвостовим відростком довжиною 12 нм, та низкою хвостових шипів (10x3 нм). Нові частки фага звільняються з клітини через 30 хвилин у бактеріофага *LIMEzero* і через 270 хвилин у *LIMElight* [4].



Секвенування геному *LIMElight* дозволило виявити одноланцюгові розриви в деяких місцях, в геномі *LIMEzero* їх не було виявлено. Два і чотири фагоспецифічних промотора були виявлені в геномах *LIMEzero* і *LIMElight*. Пізня ділянка містить гени, що кодують структурні і лізисні білки. У *LIMEzero* і *LIMElight* є 16 і 19 ранніх генів, які не мають схожості між собою і не мають аналогів в базах даних. Ці гени транскрибуються відразу після зараження і беруть участь в перетворенні господаря. Було встановлено, що ці білки адаптують механізм клітин-господарів таким чином захищаючи бактеріофаг від механізмів захисту бактерій. Фаги *LIMEzero* і *LIMElight* є першими членами родини *Podoviridae*, які заражують бактерії цього роду, їх геноми були повністю секвеновані [5].

Деякі штами *P. agglomerans* можуть бути також інфіковані фагами *Erwinia spp* [29]. Такі штами зараз активно використовують під час боротьби з *Erwinia amylovora*, яка викликає опікові захворювання яблунь і груш, *Agrobacterium tumefaciens* та проти *Pseudomonas syringae*, яка викликає захворювання ячменю за рахунок синтезу 2-аміно-3-пропанол валіну [27]. *Pantoea agglomerans* грає подвійну роль в системі з фагом *Erwinia spp*. В першу чергу, він виконує роль носія, тим самим поширюючи популяцію літичного фагу. По-друге, *P. agglomerans* також є біологічним контрольним агентом, який колонізує рослину і запобігає подальшій колонізації *E. amylovora*. Вплив цього бактеріофагу на бактерії двоякий: опосередкований фагом перенос генів може сприяти збільшенню або втраті вірулентності, активують систему рестрикції – метилування та здатні змінювати резистентність до антибіотиків. Також наявність даного фагу може спричинити морфологічні зміни клітин *P. agglomerans*. Дослідження екології збудника захворювань, а також потенційних антагоністів були підґрунтям для розробки нехімічних засобів боротьби з хворобами, що зменшує потребу в частому застосуванні антибіотиків, таких як стрептоміцин і окситетрациклін, які зазвичай використовуються для боротьби з хворобами [29].

Особливості бактерій роду *Pantoea* з виноградної лози

Методи, засновані на аналізі генів рибосомальної РНК (рРНК), показали, що філосферна мікробіота є складною і дуже різноманітною [13]. Отримані бази даних викликають велике хвилювання в зв'язку з перспективою рішення давніх питань в області філосферної мікробіології [13].

У листі виноградної лози міститься менше бактерій, ніж в ґрунті, на корінні і стеблі. Види роду *Pantoea*, виділені з виноградної лози зазвичай є ендодфітами. Секвенування генів 16S рРНК показало, що виділені бактерії з листя виноградної лози належали до *Pantoea agglomerans* [15]. При порівнянні звичайних листків лози з листям, що містять бактерії, спостерігалось підвищення в 2–2,5 рази активності ліпоксигенази. У порівнянні з листками, що не мають бактерій, активність фенілаланін-аміакліази через 6–8 годин була приблизно в п'ять разів вищою у листків, що містять *P. agglomerans*. Індукція хітинази штамами була незначною [16].

Деякі види також володіють хітинолітичною активністю. Добре відомо, що хітин, який складається із залишків N-ацетилглюкозаміну, зв'язаних



β -1,4-глікозидним зв'язком, є основним структурним компонентом більшості клітинних стінок грибів. Тому *P. agglomerans* може бути хорошим протигрибковим засобом [14]. Але деякі штами можуть бути позбавлені хітинолітичної активності. Тоді вони синтезують ендохітинази, які кодує ген *chiA*. Була визначена його повна послідовність, і виведена амінокислотна послідовність ферменту, позначена *Chia_Entag*. *Chia_Entag* має відкриту рамку зчитування з 1 686 нуклеотидів, які кодують білок з 562 амінокислот з молекулярною масою 60,880 Да. Ген *chiA*, який кодує ендохітиназу клонували, секвенували і експресували в *Escherichia coli*. Трансформований штам *E. coli* виявляв протигрибкову активність. Проведені дослідження бактеріоциногенності *P. agglomerans* показали, що бактеріоцини цієї бактерії ефективно лізували клітини цілого ряду штамів *Agrobacterium tumefaciens*, а також багато штамів інших канцерогенних бактерій [3]. Виділені штами *P. agglomerans* показали явний антагоністичний ефект проти *B. cinerea* [7].

Асоціація бактерій роду *Pantoea* з виноградною філоксерою

Нові дослідження виявили здатність рослинних патогенних бактерій використовувати комах як альтернативних господарів, оскільки вони пов'язані з певною рослиною. Зокрема, фітофагові комахи, які часто або періодично живляться на рослинних тканинах, можуть бути колонізовані епіфітними або рослинними патогенними бактеріями. Вони часто ігноруються як ключові екологічні учасники, незважаючи на те, що, швидше за все, мають зв'язок з фітопатогенними бактеріями, які знаходяться в/або на їх бажаних рослинах-хазяїнах [8].

Daktulosphaira vitifoliae відноситься до родини *Phylloxeridae* в надродині *Aphidoidea*. Цей організм викликає гали, живлячись листям і корінням багатьох видів винограду. Виникнення нових і агресивних штамів виноградної філоксери знову викликало інтерес до цієї комахи-шкідника і його екології [20].

Daktulosphaira vitifoliae – «космополітичний» ендопаразит з винограду, який індукує збагачені поживними речовинами галли на листках та коренях. Розміри паразиту коливаються від 0,3 мм до 0,8 мм. Випадкове ввезення філоксери в Європу і її рослини-господаря *Vitis vinifera* в 1860-х роках спустошило виноградне виробництво і виноробну промисловість, оскільки європейські сорти винограду не були стійкі до шкідника. Ураження рослин вірусами, бактеріями або комахами може призвести до аномального росту тканини і зміни зовнішньої морфології через пухлиноподібне утворення галів [8].

Зміни в транскриптомі зрілої листової хворої тканини дають підстави припустити, що філоксери маніпулюють генами свого виноградного господаря, щоб перепрограмувати свій метаболізм від автотрофного до гетеротрофного типу.

На листі утворюються невеликі нарости, всередині яких і знаходяться виноградні філоксери. У галах є отвір зверху, через який потім комаха виходить назовні. За один сезон одне потомство філоксери може заражати один кущ винограду близько 5 разів, піднімаючись після звільнення з галів вище, і потрапляючи на нове листя.



Для пошуку присутності мікроорганізмів в філоксері було застосовано молекулярно-біологічні методи. Використовуючи специфічні праймери ПЛР на загальній ДНК, екстрагованої з дорослих філоксер, фрагменти бактеріального походження ампліфікували, клонували і секвенували. Після аналізу отриманих перших послідовностей праймери *ragF* і *ragR* були спеціально розроблені для ампліфікації 16S рДНК *P. agglomerans*, в результаті чого були отримані окремі високоспецифічні фрагменти розміром близько 1000 п.н. Для отримання чітко видимих фрагментів потрібно від 35 до 40 циклів. Бактерії були виявлені також методом гібридизації *in situ* [10]. Для з'ясування їх функції та передачі специфічні 16S-рДНК-зонди були гібридизовані на ультра тонких ділянках дорослих листових філоксер. Сигнали були виявлені всередині слинного насоса комахи, а також в середині яєць, які перебувають в тілі комахи [10].

Бактерії роду *Pantoea* були ідентифіковані у кількох видів популяцій філоксери з використанням універсальних праймерів 16S рДНК, а саме у кореневої і листяної. Вони виявили антагоністичні ефекти проти 13 видів грибів і семи видів бактерій [15].

Бактерії роду *Pantoea* були виявлені в яйцях, у дорослих самок і в тканинах уражених листків [20]. Бактерії вважаються «вторинним» ендосимбіонтом, так як вони слабо асоційовані і не передаються по материнській лінії. Точна роль бактерій не ясна, так само як і те, чи є виділені штами специфічними. В популяціях філоксери винограду, асоційованої з бактеріями, присутня незначна генетична варіація. Виноградна філоксера проникає в паренхіматозні тканини і через це не потребує синтезу незамінних амінокислот і білків, що притаманне для видів, які живляться флоемним соком [10]. Актуальність *P. agglomerans* в цій асоціації залишається неясною, але можуть бути запропоновані дві гіпотези. Перша, свідчить про те, що бактерії можуть отримувати «вигоду» за рахунок поліпшення умов життя у викликаних філоксерою листових галах, а зараження відбувається випадково, без користі для комахи. А друга гіпотеза вказує на те, що стабільна асоціація могла розвинутися між бактеріями і *Daktulosphaira vitifoliae* з плином часу, що призвело до взаємної вигоди [20].

Але аналізи результатів культивування, проведені *in vitro*, показали, що бактерії повністю життєздатні. Це свідчить про те, що зв'язок між *D. vitifoliae* і *P. agglomerans* не такий тісний. Були продемонстровані важливі наслідки для біології комахи, включаючи вплив на ріст, розмноження та стійкість до інших паразитів. Симбіотичні і асоціативні бактерії можуть відігравати важливу роль в адаптації філоксери до різних рослин-господарів, що призводить до утворення нових біотипів. На сьогоднішній день до сих пір не відомо, чи є штами *P. agglomerans* з філоксери специфічними [8].

Бактерії роду *Pantoea* як ендофіти та епіфіти

Найбільш численними мешканцями філосфери є бактерії роду *Pantoea*. Багато пов'язаних з листям бактерій здатні рости, тобто, розмножуватися, використовуючи кілька ресурсів, які пропонує листові поверхні. Одним з важливих чинників ендофітної колонізації є наявність вуглецьвмісних поживних



речовин. Бактерії отримують доступ до рослини через рани, що призводить до, колонізації або апопласта, або ксилеми, виробництва екзополіцукридів [30].

Внутрішнє середовище судин ксилеми виноградної лози є особливою екологічною нішею, яка підтримує мікробне співтовариство. Іноді рослинний сік може просочуватися з ран, нанесених під час годування комахами або пошкодженням під час морозу. З ран рослини виділяються глюкоза, фруктоза і цукроза. Так що такі місця зазвичай мають велику кількість бактерій [13]. Але наявність поживних речовин на листках просторово неоднорідна. Бактерії зазвичай розташовані не випадковим чином, а локалізовані на жилках, продихах і трихомах [15].

Епіфітні популяції для конкурування і полегшення виживання виробляють індоліл-3 оцтову кислоту, яка викликає витік поживних речовин з рослини [23]. Індоліл-оцтова кислота є найбільш поширеним, головним ауксином з родини фітогормонів. Вона є ключовим регулятором практично всіх процесів росту і розвитку рослин, таких як органогенез, утворення судинних тканин, фототропізм і подовження клітин. Низька концентрація екзогенного ауксину викликала зростання, тоді як висока концентрація зменшувала ріст бактерії. Оскільки бактерії на рослинах часто обмежені поживними речовинами, було висунуто припущення, що велика епіфітна придатність штамів, які продукують індоліл оцтову кислоту, зумовлена підвищеною доступністю поживних речовин, викликана сильним витоком цукридів з рослинних клітин [27].

Індоліл-оцтова кислота сприяє розрихленню клітинної стінки при дуже низьких концентраціях, а екзогенно застосований ауксин стимулює вивільнення цукридів. Поряд з цим індоліл-оцтова кислота також діє як сигнальна молекула, яка допомагає розпізнавати рослини мікроорганізмам і пригнічує ріст декількох патогенних мікроорганізмів на рослинах [23]. Штами, які продукують індоліл-оцтову кислоту, значно покращують проростання насіння, утворення коренів і продуктивність рослини-хазяїна. Леткі речовини, такі як 2–3 бутандіол і ацетоїн, які продукують бактерії, мабуть, є механізмом, відповідальним за стимулювання росту рослин. Було також показано, що бактерії роду *Pantoea* продукують антибіотики і протигрибкові феноли. Наприклад, гербіколін, який використовується для лікування яблунь і груш, мікроцин, феназин. Синтез каротиноїдів, розташованих в мембрані бактерій, забезпечує стійкість до ультрафіолетового випромінювання, а також від шкідливих активних форм кисню. *Pantoea agglomerans* і близькоспоріднені види *Pantoea* виробляють фітазу, фермент, що руйнує фітат [28].

Виявлена здатність бактерій синтезувати сідерофори, які ефективно зв'язують залізо. І також виявлено здатність приймати сідерофори, які синтезують інші мікроорганізми. Бактерії роду *Pantoea* здатні конкурувати з іншими мікроорганізмами за рахунок виробництва протимікробних сполук, таких як 4-гідроксибензоат і гама-аміномасляна кислота (ГАМК). Отримання екзогенного поліцукриду, який вважається основним компонентом бактеріальної стінки, під час перебування в агрегатній структурі, може принести користь епіфітам в філосфері [18]. З огляду на те, що доступність води, ймовірно, є одним з найбільш сильно мінливих факторів на поверхнях листя, екзополі-



цукрид в агрегатах може захищати бактерії від стресу висихання. Крім того, екзогенний поліцукрид захищає від активних форм кисню, які часто зустрічаються в рослинах. Продемонстровано, що агреговані бактерії опираються окиснювальному стресу краще, ніж планктонні бактерії. Через здатність ендофітів розмножуватися усередині рослинної тканини, вони частіше взаємодіють з господарем, ніж ризосферні бактерії. Ці характеристики роблять бактеріальних ендофітів чудовими кандидатами для розробки стратегій у вирощуванні сільськогосподарських культур [16].

Патогенні властивості бактерій роду *Pantoea*

Патогенні бактерії мають фактори патогенності, які включають систему секреції типу III (ТЗСС), кворум сенсинг і екзополіцукриди (EPS) [17].

Система секреції типу III є ключовим фактором вірулентності, що використовується протеобактеріями, забезпечує транспорт ефекторних молекул з цитоплазми бактерії в клітини рослини. Ефекторні білки викликають реорганізацію цитоскелету клітини-господаря, що сприяє проникненню бактерії в клітину-хазяїна, а також викликають різні порушення функцій клітин, що призводять в підсумку до виникнення патологічного процесу. Цю систему ще називають «контакт- залежною», так як секреція ефекторних білків відбувається після контакту бактерії з клітиною-хазяїна. Здатність бактерій розмножуватися усередині їх господарів і індукувати некротичні прояви залежить від їх генів *hgr*, які кодують компоненти ТЗСС і, ймовірно, вірулентні білки, що секретуються через цю систему. Гени *hgr* пригнічуються, коли бактерії культивуються в складних середовищах, але ростуть до високих рівнів, коли бактерії ростуть в рослинному апопласті або знаходяться в тісному контакті з рослинними клітинами [31].

Гени *hgr*, також експресуються, коли бактерії ростуть в мінімальному середовищі. Цукроза позитивно впливає на експресію гена, в той час як сукцинат, цитрат і глутамат її пригнічують. Індукція генів *hgr* у бактерій відбувається на ранній стадії після контакту з рослиною. Нгр-залежна білкова секреція потрібна, також, для виявлення гіперчутливої відповіді у інших рослин, які не є хазяїнами. Гіперчутлива відповідь – це запрограмована загибель рослинних клітин в місці зараження патогеном. Вона призводить до поліпшення росту рослин, підвищенню врожайності і якості за рахунок стимулювання захисної реакції [13].

Багато бактеріальних білків, які називаються авірулентними (Avr), транспортуються всередину клітини рослини через систему секреції Нгр [13]. Потрапивши в рослину, вони розпізнаються рослинними білками і можуть викликати гіперчутливу відповідь у не хазяйських рослин. На експресію генів *hgr* також впливає рН. Гени *hgr* найкраще синтезуються при рН близько 5,5. Загальна роль системи секреції типу III полягає в тому, щоб доставити ефекторні білки і фактори патогенності у клітини рослини-хазяїна, які забезпечують інфікування і розвиток захворювання. Ефекторні білки, вироблені системою секреції III типу дуже важливі для забезпечення патогенності у фітопатогенних бактерій [13].

Кворум сенсинг необхідний для координації експресії генів в залежності



не тільки від умов зовнішнього середовища, а й від щільності бактеріальної популяції через необхідність досягти критичної щільності для ефективного поширення. Таким чином бактерії роду *Pantoea* регулюють синтез антибіотиків, рівень метаболізму і, навіть, поведінку популяцій. Для підтримки кворум сенсингу бактерії постійно виробляють і виділяють у зовнішнє середовище специфічні сигнальні молекули. Бактерії роду *Pantoea* виділяють сигнальну речовину ацил-гомосерин-лактон [21]. Коли його концентрація в середовищі досягає «порогового» значення (це відбувається при високій щільності популяції), в бактеріальних клітинах активується регуляторний білок. Також сигнальні молекули можуть активно пригнічувати імунну відповідь рослин. Гени *pagRI*, необхідні для виробництва ацил-гомосерин-лактонового аутоіндуктора *PagI* і регулятора транскрипції *PagR*, беруть участь у регуляції генів екологічної придатності і вірулентності у бактерій різних видів *Pantoea*. Продемонстровано, що *P. agglomerans* викликає гали, виробляючи індоліл-оцтову кислоту [11].

Оскільки патогенні бактерії існують як популяції, члени яких виявляють різну ступінь вірулентності, інтеграція генетичних, еволюційних і епідеміологічних досліджень може дати важливу інформацію про походження та розповсюдження бактеріальних захворювань. В останні роки ряд розробок поліпшив можливості для проведення комплексних досліджень, можливо, головним з них є збільшення швидкості і зниження витрат часу на визначення нуклеотидної послідовності. Генерація великих обсягів даних послідовностей, в поєднанні з розробкою нових аналітичних методів, обіцяє краще розуміння складнощів еволюції бактеріальних популяцій [11].

Методи виділення бактерій роду *Pantoea*

Ідентифікація фітопатогенних бактерій видів роду *Pantoea* ускладнена через високий ступінь фенотипової подібності між видами цього роду і родини *Enterobacteriaceae* [11]. Хоча фізіологічні характеристики дають уявлення про те, яка потенційна метаболічна диференціація могла статися під час видоутворення, можуть виникати невідповідності через диференціальну експресію генів у різних ізолятів або регуляцію експресії в певних середовищах. Види *Pantoea* зазвичай характеризуються по морфології колоній, фізіологічних і біохімічних реакціях, а в деяких випадках – аналізу спектру жирних кислот або хінону. Однак цей підхід виявився ненадійним, оскільки ідентифікація, заснована виключно на фенотипових характеристиках, призвела до помилкової ідентифікації багатьох штамів, що належать комплексу «*Erwinia herbicola* – *Enterobacter agglomerans*» [31].

Для міжвидових порівнянь набір генів бактерій роду *Pantoea* (розрахований з 21 генома) складається з 1862 генів. Види роду фенотипово тісно пов'язані, що ускладнює швидко ідентифікацію штамів роду *Pantoea* на рівні видів. З труднощами, які раніше виникали при диференціації видів роду *Pantoea*, як фенотипово, так і філогенетично і ґрунтуючись на секвенуванні 16S рРНК, штами зазвичай можуть бути віднесені до роду *Pantoea*, але часто не до конкретних видів [12].

Секвенування гена 16S рРНК зазвичай використовується при іден-



тифікації бактеріальних видів і вважається стандартним елементом опису бактеріальних таксонів. Однак послідовності 16S рРНК занадто висококонсервативні, щоб надійно диференціювати близькі види, як це має місце в даному роді [26]. Однак з часом, коли різноманітність досліджуваних зразків збільшилася, стало зрозуміло, що тільки одна послідовність гену 16S рРНК не забезпечує достатніх філогенетичних даних. Тому для отримання повного дерева були застосовані більш надійні підходи до філогенетичного аналізу, а саме метод мультилокусного секвенування генів (MLSA) [16].

Неповні послідовності генів, що кодують білок, виявилися необхідними для ідентифікації видів і філогенетичних маркерів в родині *Enterobacteriaceae*. З цією метою були оцінені такі гени: *groB*, *infB*, *groEL*; *gyrB*, *tuf* і *atpD*, *carA* і *gcsA*. Результати показали, що вони надійніші, ніж послідовності генів 16S рРНК для ідентифікації видів і для визначення внутрішніх і деяких міжвидових зв'язків. Дані послідовності мають розмір: *gyrB* (742 bp), *groB* (637 bp), *atpD* (657 bp) та *infB* (615 bp). Ці гени кодують ДНК-гіразу, субодиницю РНК-полімерази β , субодиницю АТФ-синтази β і фактор ініціації трансляції. Отже, MLSA неповні нуклеотидних послідовностей генів *gyrB*, *groB*, *atpD* та *infB* може використовуватися для класифікації, ідентифікації та філогенетичного аналізу штамів роду *Pantoea* [28].

Завдяки мультилокусному аналізу послідовностей виявлено, що різні типи штамів *P. agglomerans* тісно пов'язані і мають подібну специфічність і вірулентність. Важливо, що стійкість до фосфоміцину спостерігалася для всіх штамів *P. agglomerans*, але не для інших видів, і, таким чином, може бути корисним і простим методом для ідентифікації. Мультилокусне секвенування білок-кодувальних генів виступає як додатковий аналіз для ідентифікації *P. agglomerans* і для характеристики нетипових штамів [16].

Особливості використання бактерій роду *Pantoea*

Патогенні властивості цієї бактерії врівноважуються неймовірно корисними рисами, виявленими у *P. agglomerans*, і близькородинних видів цього роду [19].

Бактерії роду *Pantoea*, ізольовані з рослин, володіють багатьма корисними рисами, які можуть бути використані для профілактики і лікування захворювань людини і тварин, боротьби з патогенами рослин, стимулювання росту рослин і біоремедіації навколишнього середовища. *P. agglomerans* успішно використовується для боротьби з *Rhizopus stolonifer* і *Monilinia laxa*. Виробляє ряд антибіотиків, які можна використовувати для боротьби з патогенами рослин, захворюваннями тварин і людини. Ліпополіцукрид з низькою молекулярною масою, виділений з *P. agglomerans* демонструє ряд лікувальних властивостей. Наприклад, ліпополіцукрид представляє собою компонент ліків, які потенційно можуть вилікувати рак. Його також використовують в розробці ліків від малярійного плазмодію. [19]. Були зроблені успішні спроби застосувати стратегію паратрансгенеза, в якій бактеріальні симбіонти генетично сконструйовані для експресії і секреції білків проти малярійного плазмодія. Використання як агента біоконтролю дозволяє знизити дози пестицидів, будучи екологічно чистим процесом [9].



Узагальнення

Роль виділених з виноградної лози бактеріальних видів двояка. Вони можуть супроводжувати патогенні бактерії і викликати різноманітні захворювання винограду. Також викликати серйозні захворювання людини. Не випадково, що багато хто з найбільш ефективних агентів біоконтролю хвороб рослин також є потенційними патогенами людини. Вони дуже активно конкурують за поживні речовини і можуть продукувати протимікробні метаболіти і самі по собі можуть бути стійкими до деяких антибіотиків. Вживання при захисних реакціях рослини може зробити ендofітні популяції бактерій стійкими до захисту організму людини [30].

До корисних властивостей можна віднести синтез антибіотиків і також прояв антипроліферативної активності проти пухлинних клітин людини. Для цього використовують низькомолекулярний ліполіцукрид з *P. agglomerans*. Ще однією позитивною якістю є сприяння зростанню рослин різними механізмами. Сюди можна віднести виділення екзополіцукридів, синтез індоліл-оцтової кислоти. Також деякі штами *P. agglomerans* використовують для боротьби з малярійним плазмодієм. Крім того, бактерії роду *Pantoea* володіють унікальною здатністю до біодеструкції, включаючи гербіциди та інші токсичні сполуки, що відкриває перспективи для розробки і комерціалізації корисних продуктів. Проте потрібно зважати на велику невизначеність щодо асоціації цих бактерій з хазяїном і патогенетичними властивостями окремих штамів.

Також вони здатні пригнічувати ріст багатьох патогенних та шкідливих бактерій. Однак, комерційна реєстрація продуктів біоконтролю *P. agglomerans* ускладнена, тому що цей вид в даний час зазначений як організм біологічної безпеки 2 (BL2) через клінічні повідомлення як опортуністичний патоген людини [28]. Незважаючи на доведену патологічну роль *P. agglomerans* при виникненні захворювань алергічного і імунотоксичного тла і випадкових інфекцій, корисні риси цього роду *Pantoea* мають велике значення для потенційного використання в багатьох областях біотехнології [14].

Т. В. Іваница, И. В. Страшнова, Д. С. Смальчук

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38(048) 746 61 02, e-mail: t.ivanytsia@gmail.com

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ РОДА *PANTOEA*

Реферат

В обзоре представлены данные современных источников литературы о бактериях рода *Pantoea*. Приведены общие культуральные, биохимические и морфологические свойства бактерий данного рода. Детально рассмотрены геном и генетические элементы, их влияние на рост и поведение микроорганизмов. Также описана ассоциация бактерий этого рода с *Daktulosphaera vitifoliae* – вредителем винограда, и рассмотрено возможное влияние бактерий на виноградную филлоксеру. Рассмотрены эндofитные и эпифитные



свойства и особенности представленных видов. Описаны патогенные свойства и особенности выделения бактерий рода *Pantoea agglomerans*. Приведенные примеры практического использования данных бактерий.

Ключевые слова: бактерии рода *Pantoea*, виноградная лоза, *Daktulosphaira vitifoliae*.

T. V. Ivanytsia, I. V. Strashnova, D. S. Smalchuk

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska St., Odesa, 65082. Ukraine,
tel.: +38(048) 746 61 02, e-mail: t.ivanytsia@gmail.com

CHARACTERISTICS OF BACTERIAL GENUS *PANTOEA*

Summary

The review presents data according to the modern sources of literature data about bacteria of the genus *Pantoea*. The general cultural, biochemical and morphological properties of bacteria of this genus are presented. The genome and genetic elements, their influence on the growth and behavior of microorganisms are considered in detail. It also describes the association of bacteria of this genus with *Daktulosphaira vitifoliae*, a pest of grape, and examines the possible effects of bacteria on grape phylloxera. The endophytic and epiphytic properties and features of the presented species are illuminated. Pathogenic properties and the features of isolation of bacteria of the genus *Pantoea agglomerans* are considered. The examples of practical use of bacteria data are given.

Key words: genus of bacteria *Pantoea*, grape, *Daktulosphaira vitifoliae*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Булигіна Т. В., Яковлева Л. М., Броварська О. С., Варбанець Л. Д. Серологічні властивості та біологічна активність ліпополісахаридів *Pantoea agglomerans* // Мікробіол. журн. 2015. – 77, № 6. – С. 11–20.
2. Л. Д. Варбанец, О. С. Броварская, Т. Н. Булыгина, Е. Г. Гаркавая, Н. В. Житкевич. Характеристика липополісахаридов *Pantoea agglomerans* // Мікробіологія. – 2014. – 83, № 6. С. 656–666.
3. Лиманська Н. В., Іваниця В. О., Сергєєва Ж. Ю., Товкач Ф. І. Бактеріоциногенна активність штамів *Rhizobium vitis* і *Pantoea agglomerans*, виділених з рослин винограду // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – № 4. – С. 26–32.
4. Evelien M. Adriaenssens, Pieter-Jan Ceysens, Vincent Dunon, Hans-Wolfgang Ackermann, Johan Van Vaerenbergh, Martine Maes, Maurice De Proft, Rob Lavigne Bacteriophages LIMelight and LIMEzero of *Pantoea agglomerans*, belonging to the “phiKMV-Like Viruses” // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77, № 10. – P. 3443–3450.
5. Rudi Emerson de Lima Procópio, Welington Luiz Araújo, Fernando Dini Andreote, João Lúcio Azevedo Characterization of a small cryptic plasmid from endophytic *Pantoea agglomerans* and its use in the construction of an expression vector // Genet. Mol. Biol. – 2011. – Vol. 34. – P. 103–109.



6. Aziz A., Biagianti S., Couderchet M. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea* // Environmental and Experimental Botany. – 2008. – Vol. 64. – P. 21–32.

7. Berenbaum M. R., Haus M. J., Nabity P. D. Leaf-galling phylloxera on grapes reprograms host metabolism and morphology // National Academy of Sciences. – 2013. – Vol. 110, № 41. – P. 16663–16668.

8. Bisi D. C., Lampe D. J. Secretion of Anti-Plasmodium Effector Proteins from a Natural *Pantoea agglomerans* Isolate by Using PelB and HlyA Secretion Signals // Applied and environmental microbiology. – 2011. – Vol. 77, № 3. – P. 4669–4675.

9. Blaich R., Forneck A., Sonntag K., Vorwerk S. Application of current in situ hybridization techniques for grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*, Fitch) and grapevine (*Vitis* spp. L.) // Vitis. – 2008. – Vol. 47, № 2. – P. 113–116.

10. Brady C. L., Cleenwerck I., Venter S.N. A FAFLP system for the improved identification of plant-pathogenic and plant-associated species of the genus *Pantoea* // Systematic and Applied Microbiology. – 2007. – Vol. 30. – P. 413–417.

11. Brady C.L., Cleenwerck I., Venter S.N. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2010. – Vol. 60. – P. 2430–2440.

12. Brencic A., Winans S.C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2005. – Vol. 69, № 1. – P. 155–194.

13. Bruez E., Haidar R., Alou M. T., Vallance J., Bertsch C., Mazet F., Fermaud M., Deschamps A., Guerin-Dubrana L., Compant S., Rey P. Bacteria in a wood fungal disease: characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines // Front Microbiol. – 2015. – Vol. 6. – P. 1137–1149.

14. Bulgari D., Casati P. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR // The Journal of Microbiology. – 2009. – Vol. 47, № 4. – P. 393–401.

15. Decré D., Delétoile A. Phylogeny and Identification of *Pantoea* Species and Typing of *Pantoea agglomerans* Strains by Multilocus Gene Sequencing // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47, № 2. – P. 300–310.

16. Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Lemieszek M. K., Golec M., Skórska C., Góra-Florek A., Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part II – Deleterious effects: Dust-borne endotoxins and allergens – focus on grain dust, other agricultural dusts and wood dust // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2016. – Vol. 23, № 1. – P. 6–29.

17. Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Kinga Lemieszek M., Golec M., Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2016(a). – Vol. 23, № 2. – P. 197–205.



18. Jacek Dutkiewicz, Barbara Mackiewicz, Marta Kinga Lemieszek, Marcin Golec, Janusz Milanowski *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2016(b). – Vol. 23, № 2. – P. 206–222.

19. Forneck A., Martinez-Torres D., Vorwerk S. *Pantoea agglomerans*-associated bacteria in grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*, Fitch) // Agricultural and Forest Entomology. – 2007. – Vol. 9. – P. 57–64.

20. Yang J., Yu J., Jiang J., Liang C., Feng Y. D-tyrosine affects aggregation behavior of *Pantoea agglomerans* // J. of Basic Microbiology. – 2017. – Vol. 57, №2. – P. 184 – 189.

21. Kado C. I. *Erwinia* and Related Genera // The Prokaryotes: Proteobacteria: Gamma Subclass. – 2006. – Vol. 6. – P. 443–450.

22. Kulkarni G. B., Nayak A. S., Sajjan S. S., Oblesha A., Karegoudar T. B. Indole-3-acetic acid biosynthetic pathway and aromatic amino acid aminotransferase activities in *Pantoea dispersa* strain GPK // Lett Appl Microbiol. – 2013. – Vol. 56, №5. – P. 340–347.

23. Leveau H. J., Tecon, R. Symplasmata are a clonal, conditional, and reversible type of bacterial multicellularity // Sci. Rep. №6. – 2016.

24. Pieter De Maayer Wai-Yin Chan, Jochen Blom, Stephanus N. Venter, Brion Duffy, Theo H M Smits., Teresa A Coutinho. The large universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification // BMC Genomics. – 2012. – Vol. 13. – P. 625–637.

25. Marike Palmer, Emma T. Steenkamp, Martin P.A. Coetzee, Jochen Blom, Stephanus N. Venter Genome-Based Characterization of Biological Processes That Differentiate Closely Related Bacteria // Front Microbiol. – 2018. – Vol. 9. – P. 113–136.

26. Reiher K., Sammer U.F., Spiteller D., Wensing A. Assessment of the relevance of the antibiotic 2-amino-3-(oxirane-2,3-dicarboxamido)-propanoyl-valine from *Pantoea agglomerans* biological control strains against bacterial plant pathogens // MicrobiologyOpen. – 2012. – Vol. 1. – P. 438–449.

27. Rezzonico F., Smits T. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains // BMC Microbiology. – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 204.

28. Roach D. R., Sjaarda D. R., Sjaarda C. P., Ayala C. J., Howcroft B., Castle A. J., Svircev A. M. Absence of lysogeny in wild populations of *Erwinia amylovora* and *Pantoea agglomerans* // Microbial Biotechnology. – 2015. – Vol. 8, № 3. – P. 510–518.

29. Rosenblueth M., Romero E. M. Bacterial endophytes and Their Interactions with Hosts // Molecular Plant-Microbe Interactions Journal. – 2006. – Vol. 19, № 8. – P. 827–837.

30. Stavrínides J., Walterson A. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae* // FEMS Microbiology Reviews. – 2015. – Vol. 39. – P. 968–984.

31. Tindall B. J. The combination *Enterobacter agglomerans* is to be cited as *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 and the combination *Pantoea agglomerans* is to be cited as *Pantoea agglomerans* (Beijerinck 1888) Gavini et al. 1989 // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2014. – Vol. 64. – P. 3582–3583.



References

1. *Bulygina TV, Yakovleva LM, Brovarska OS, Varbanets LD*. Serological properties and biological activity of lipopolysaccharides *Pantoea agglomerans* // *Microbiologic journal*. 2015. – 77, №6. – P. 11–20.
2. *Varbanets LD, Brovarska OS, Byligina, Garkovaya EG, NV Zhytkevich* Characteristics of lipopolysaccharides of *Pantoea agglomerans* // *Microbiology*. – 2014. – 83, №6. С. 656-666.
3. *Limanska NV, Ivanytsia VO, Sergeeva ZhYu, Tovkach FI* Bacteriocinogenic activity of strains *Rhizobium vitis* i *Pantoea agglomerans*, isolated from grape plant // *Microbiology and biotechnology*. – 2009. – № 4. – P. 26–32.
4. *Evelien M, Adriaenssens Pieter-Jan Ceysens, Vincent Dunon, Hans-Wolfgang Ackermann, Johan Van Vaerenbergh, Martine Maes, Maurice De Proft, Rob Lavigne* Bacteriophages LIMELight and LIMEzero of *Pantoea agglomerans*, belonging to the “phiKMV-Like Viruses”. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77 (10): 3443–3450.
5. *Rudi Emerson de Lima Procópio, Welington Luiz Araújo, Fernando Dini Andreote, João Lúcio Azevedo* Characterization of a small cryptic plasmid from endophytic *Pantoea agglomerans* and its use in the construction of an expression vector. *Genet. Mol. Biol.* 2011; 34: 103–109.
6. *Aziz A, Biagianti S, Couderchet M*. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas spp.* mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*. 2008; 64: 21–32.
7. *Berenbaum MR, Haus MJ, Nabity PD*. Leaf-galling phylloxera on grapes reprograms host metabolism and morphology. *National Academy of Sciences USA*. 2013; 110 (№41):16663–16668.
8. *Bisi DC, Lampe DJ*. Secretion of Anti-Plasmodium Effector Proteins from a Natural *Pantoea agglomerans* Isolate by Using PelB and HlyA Secretion Signals. *Applied and environmental microbiology*. 2011; 77 (3): 4669–4675.
9. *Blaich R, Forneck A, Sonntag K, Vorwerk S*. Application of current in situ hybridization techniques for grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*, Fitch) and grapevine (*Vitis spp.* L.). *Vitis*. 2008; 47 (2) : 113–116. Available at: <https://www.vitis-vea.de/admin/volltext/w1%2008%20897.pdf>
10. *Brady CL, Cleenwerck I, Venter SN*. A FAFLP system for the improved identification of plant-pathogenic and plant-associated species of the genus *Pantoea*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2007; 30: 413–417.
11. *Brady CL, Cleenwerck I, Venter SN*. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica sp. nov.*, *Pantoea eucrina sp. nov.*, *Pantoea brenneri sp. nov.* and *Pantoea conspicua sp. nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010; 60: 2430–2440.
12. *Brencic A, Winans SC*. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005; 69 (1): 155–194.
13. *Bruez E, Haidar R, Alou MT, Vallance J, Bertsch C, Mazet F, Fermaud M, Deschamps A, Guerin-Dubrana L, Compant S, Rey P*. Bacteria in a wood fungal



disease: characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1137–1149.

14. Bulgari D, Casati P. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. *The Journal of Microbiology.* 2009; 47 (4) : 393–401.

15. Decré D, Delétoile A. Phylogeny and Identification of *Pantoea* Species and Typing of *Pantoea agglomerans* Strains by Multilocus Gene Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (2):300–310.

16. Dutkiewicz J, Mackiewicz B, Lemieszek MK, Golec M, Skórska C, Góra-Florek A, Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part II – Deleterious effects: Dust- borne endotoxins and allergens – focus on grain dust, other agricultural dusts and wood dust. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* 2016; 23(1): 6–29.

17. Dutkiewicz J, Mackiewicz B, Kinga Lemieszek M, Golec M, Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* 2016; 23(2):197–205.

18. Jacek Dutkiewicz, Barbara Mackiewicz, Marta Kinga Lemieszek, Marcin Golec, Janusz Milanowski *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* 2016; 23(2): 206–222.

19. Forneck A, Martinez-Torres D, Vorwerk S. *Pantoea agglomerans*-associated bacteria in grape phylloxera (*Daktulosphaera vitifoliae*, Fitch). *Agricultural and Forest Entomology.* 2007; 9: 57–64.

20. Yang J, Yu J, Jiang J, Liang C, Feng Y. D-tyrosine affects aggregation behavior of *Pantoea agglomerans*. *J. of Basic Microbiology.* 2017; 57 (2): 184–189.

21. Kado CI. *Erwinia* and Related Genera. *The Prokaryotes: Proteobacteria: Gamma Subclass.* 2006; 6: 443–450.

22. Kulkarni GB, Nayak AS, Sajjan SS, Oblesha A, Karegoudar TB. Indole-3-acetic acid biosynthetic pathway and aromatic amino acid aminotransferase activities in *Pantoea dispersa* strain GPK. *Lett Appl Microbiol.* 2013; 56 (5): 340–347.

23. Leveau HJ, Tecon R. Symplasmata are a clonal, conditional, and reversible type of bacterial multicellularity. *Scientific Reports.* 2016; (6). Available at: <https://www.nature.com/articles/srep31914>

24. Pieter De Maayer Wai-Yin Chan, Jochen Blom, Stephanus N Venter, Brion Duffy, Theo H M Smits, Teresa A Coutinho. The large universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification. *BMC Genomics.* 2012; 13: 625–637.

25. Marike Palmer, Emma T Steenkamp, Martin PA Coetzee, Jochen Blom, Stephanus N. Venter Genome-Based Characterization of Biological Processes That Differentiate Closely Related Bacteria. *Front Microbiol.* 2018; 9: 113–136.

26. Reiher K, Sammer UF, Spiteller D, Wensing A Assessment of the relevance of the antibiotic 2-amino-3-(oxirane-2,3-dicarboxamido)-propanoyl-valine from *Pantoea agglomerans* biological control strains against bacterial plant pathogens. *MicrobiologyOpen.* 2012; 1: 438–449.



27. Rezzonico F, Smits T. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains . BMC Microbiology. 2009; 9(1): 204.

28. Roach DR, Sjaarda DR, Sjaarda CP, Ayala CJ, Howcroft B, Castle AJ, Svircev AM. Absence of lysogeny in wild populations of *Erwinia amylovora* and *Pantoea agglomerans*. Microbial Biotechnology. 2015; 8(3): 510–518.

29. Rosenblueth M, Romero EM. Bacterial endophytes and Their Interactions with Hosts. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal. 2006; 19(8): 827–837.

30. Stavriniades J, Walterson A. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae*. FEMS Microbiology Reviews. 2015; 39: 968–984.

31. Tindall BJ. The combination *Enterobacter agglomerans* is to be cited as *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 and the combination *Pantoea agglomerans* is to be cited as *Pantoea agglomerans* (Beijerinck 1888) Gavini et al. 1989. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014; 64: 3582–3583.

Стаття надійшла до редакції 20.08.2018 р.



**S. L. Golembiovska, T. V. Dvornyc, L. V. Polishchuk,
B. P. Matselykh**

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology (IMV), NAS of Ukraine,
154, Zabolotnogo Str., Kyiv, Ukraine, 03680, tel.:+38 (044) 522 67 62, e-mail:
Golembiovska@ukr.net

**VARIABILITY OF CAROTENOID-SYNTHETIC STRAINS
STREPTOMYCES GLOBISPORUS 1912 AFTER DEEP
CULTIVATION AND STORAGE**

Aim. To determine the variability of the trait of carotenoids biosynthesis in two mutant strains *Streptomyces globisporus* 1912 after deep cultivation and storage.

Relevance. Study of the spontaneous variability of strains-producers of carotenoids after deep cultivation and long-term storage is necessary for understanding the mechanisms of intrapopulation inheritance and the possibility of their control.

Methods. Visually the analysis of phenotype of streptomyces colonies, statistical analysis was performed with Windows Software Excel 2007. **Results.** The appearance of non-productive/non-active variants (yellow, creamy and colorless) in populations of strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt after cultivation in corn-soy liquid medium was 10^{-3} and 10^{-2} , at 1–2 orders of magnitude higher than their standard cleavage with frequent transplantation of subcultures. The variability during storage had high indexes, which were dependent on storage temperature. Non-productive variants of strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt at storage temperature of 4 °C were about 50% and 10% of the population, respectively. There were near 10% non-active colonies in the population of strain *S. globisporus* 4Lcp-Hp7, and 20–30% ones in the case strain *S. globisporus* 7Crt at storage temperatures of 21 °C and 28 °C. After one-year storage near 52% and 66% colonies of the populations of lyophilized cultures *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt supported the high level of synthesis of corresponding carotenoids. **Conclusions.** It has been shown, that the trait of carotenoids biosynthesis in the mutant strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt was showing variability with the high frequency after deep cultivation (10^{-3} and 10^{-2} non-active colonies) and during long storage on slants and in lyophilized state (10–50%).

Key words: *Streptomyces*, carotenoid biosynthesis, variability, storage.

The variability of microorganisms is a result of changes in a cell under the influence of endo- and exogenous factors. This term is used to detect the changes of a trait in populations. The variability is determined by the high frequency of variants, which differ from the typical ones with respect to the total number of tested units, in particular, sown bacteria *in vitro*. The reasons of variability in the population can be the substrate deficiency, the deactivation of synthesis enzymes, a cryptic form of a gene or its defects.



Our work is devoted to the variability of the trait of carotenoids biosynthesis in two mutants of strain *Streptomyces globisporus* 1912. Founded in 1998 the collection of carotenoid-synthetic mutants today includes about two dozen of mutant strains. The sequences of the *crt*-genes of one of the collection strain were presented in the NCBI database (Accession number KM349312) [10]. Mutant strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt are the leaders of the collection by biotechnological characteristics. They are characterized by high productivity and stability of carotenoid biosynthesis in compared with other strains of the collection. The standard cleavage with the formation of non-active variants at constant work with fresh 7–10 day-old cultures *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt on corn-soy agar has been 10^{-5} and 10^{-3} , respectively, that we have researched earlier [6, 9, 13]. Also, the addition of bacteria biomass of researched strains into the diet of oviparous hens has contributed to their productivity and improvement of physiological parameters [4].

Unfortunately, the researched strains can maintain stable values of spontaneous variability only with frequent transplantation of the subcultures. Deep cultivation, long-term storage, and lyophilization have contributed to the accumulation of a large number of non-active colonies in populations of strains. The variability indicators were different and differed from the standard ones. Therefore, in order to understand the mechanisms of intrapopulation inheritance of the carotenoid biosynthesis trait during long-term storage and the possibility of its control in deep cultivation, the actual tasks were to study the indices of spontaneous variability in strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt in the named processes.

The aim of study was to determine the variability of the trait of carotenoids biosynthesis of strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt in the processes of deep cultivation and storage. The objectives of the study were to determine: 1) spontaneous variability frequency of strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt after cultivation in a corn-soy liquid medium; 2) variability indexes of researched strains after 3 and 6 months storage on corn-soy slants; 3) variability indexes of carotenoids strains-producers after a year of storage in the freeze-dried state.

Materials and Methods

Carotenoid-producing strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt were used in the work (Fig. 1). Strain *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 accumulates carotenoid lycopene, 50 ± 2.5 mg/l [9, 13]. Strain *S. globisporus* 7Crt synthesizes a mixture of carotenoids of lycopene and beta-carotene, 35 ± 2.0 mg/l [6, 13].

Mediums and growth conditions. Bacteria cultures of researched strains were grown on a corn-soy medium, (g/l): corn flour 20.0; soybean flour 10.0; NaCl 5.0; pH 7.0. Faybich's medium for the lyophilization of the samples contained 10% sucrose and 2% gelatin. The solutions of sucrose and gelatin were separately sterilized and then were mixed in appropriate proportions. Agar-agar content for solid mediums has been 15,0 g/l. The level of pH was been correcting by hydrochloric acid and sodium hydroxide. Sterilization was at t 120 °C, for 30 min.

The analysis of the variability of researched strains. Carotenoids lycopene and beta-carotene are pigments, the presence of their synthesis is visible by a naked



eye. Their accumulation appears in the coloration of mycelium. The synthesis of lycopene by strain *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 is morphologically manifested the staining of mycelium by pink color (Fig. 1A). The accumulation of mixture of lycopene and beta-carotene stains colonies of strain *S. globisporus* 7Crt by orange color (Fig. 1B). Amount of carotenoids accumulation is proportional to the saturation of colony color. Cream and yellow colonies of researched strains accumulate corresponding carotenoids in smaller quantities than productive variants, whereas colorless ones have not synthesized carotenoids [13]. Given the biotechnological perspective of the strains, colonies with color intensity lower than of productive ones were considered non-productive/non-active analogically of colorless.

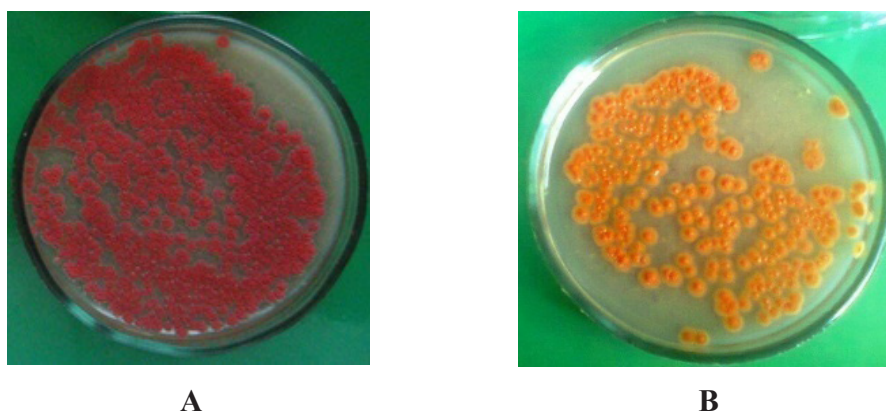


Fig. 1. Five-day colonies of *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 (A) and *S. globisporus* 7Crt (B) on corn-soy agar with standard cleavage

Washed mycelium off the surface of slants and suspensions after cultivation in a liquid medium were used for research. Suspensions with mycelium of strains were being homogenized, were being filtered and were being sown in dilutions on the surface of the corn-soy agar in Petri dishes. Cultures were incubated at t 28 °C for 4–7 days, under dark conditions (thermostat). Activity of carotenoids biosynthesis was analyzed visually according to the intensity of colony staining. Calculation of the number of colonies was done by the traditional way of enumerating CFUs. The variability frequency of carotenoids biosynthesis of researched strains was made on the basis of calculation of unproductive variants among the total number of tested colonies. Statistical analysis was performed with Windows Software Excel 2007.

The storage. Carotenoid-synthetic mutants every three or six months were transferred to fresh slants with corn-soy agar (tubes 20x150). Cultures of cells were washed off from the surface of agar-medium by sterile distilled water and were transferred by sterile pipettes to slants with fresh nutrient agar-medium and were incubated under thermostat conditions at t 28 °C, for 7 days. Half of the duplicated subcultures were filled up with sterile mineral oil. Studied storage temperatures were 4 °C in the refrigerator, 21 °C at room temperature and 28 °C under thermostat conditions. The periods of storage were 3 and 6 months. The percentage of active variants in bacteria populations of researched strains during storage for 3 and 6



months was calculated based on the data of last 4 and 6 years, respectively.

Methods of lyophilization described in the literature were used for freeze-dried researched strains [5]. Biomasses of cultures were mixed with protective medium and obtained suspensions were carried into ampoules (V 10 ml) of 1 ml (10^9 – 10^{10} CFUs) in each one. The samples were lyophilized at 40 °C, were dried, were sealed and were stored away from direct light at 21 °C. After one year of storage sterile distilled water was added to the material in ampoules to the level of V 1ml. The obtained suspension was poured by pipette into the liquid medium with the volume of 9 ml and was cultured at 240 rpm, 28 °C for 2 hours for adaptation. After that, the cultures were sown in dilution on the surface of the nutrient agar in Petri dishes and grown. The material from each ampoule of identical cultures (3pcs) was counted separately.

Results and Discussion

The variability of researched strains after cultivation in liquid medium.

Selected cultures of producers *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt with early and intensive carotenoids synthesis has been used for deep cultivation. The variability of carotenoids producers before deep cultivation in the liquid medium was standard. The yield of carotenoids from strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt after cultivation in the liquid medium was 41±2,0 mg/l and 29±1,5 mg/l, respectively. The productivity of strains was decreasing by almost 20%. Non-active variants in bacteria populations of strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt were accumulating with the frequency of 10^{-3} and 10^{-2} , respectively (Fig. 2). The variability of the trait of carotenoids biosynthesis of researched strains under cultivation in the liquid medium was on 1–2 orders of magnitude higher of standard cleavage that was the reason of decrease of yield of carotenoids.

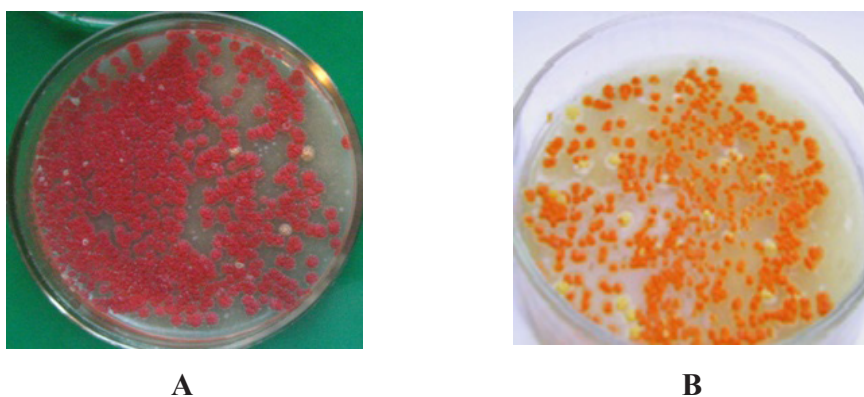


Fig. 2. Five-day colonies *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 (A) and *S. globisporus* 7Crt (B) after cultivation in liquid medium

Reduction of oxygen access under liquid cultivation conditions is probably one of the reasons of cleavage of the researched phenotypic trait in strain populations. In particular, the growth of strains has been accompanied by rapid

absorption of oxygen under liquid cultivation conditions. In particular, the amount of dissolved oxygen after 17 hours of cultivation has been 7+1% at the initial 70%. The frequency of mixing has been 200 rpm and volume of supplied air has been 3.5V/Vs. In literature the cases of increasing of cleavage in the process of liquid cultivation conditions due to lack of oxygen have been describing. The need of oxygen is described for the processes of accumulation of carotenoids in fermentation conditions for fungi [1, 16].

The variability of the trait of carotenoid biosynthesis of strains after storage on nutrient slants. All carotenoid-synthetic mutants at first years after obtaining were storing in the refrigerator at t 4 °C, which as it turned out later contributed to the accumulation of non-active variants. It was suggested that the storage temperature can influence their variability. It was decided to research cleavage of producer cultures after 3 and 6 months of storage at t 4 °C, 21°C and 28 °C with the protective coating (mineral oil) of air mycelium of strains on slants and without it. The results are shown in Figure 3.

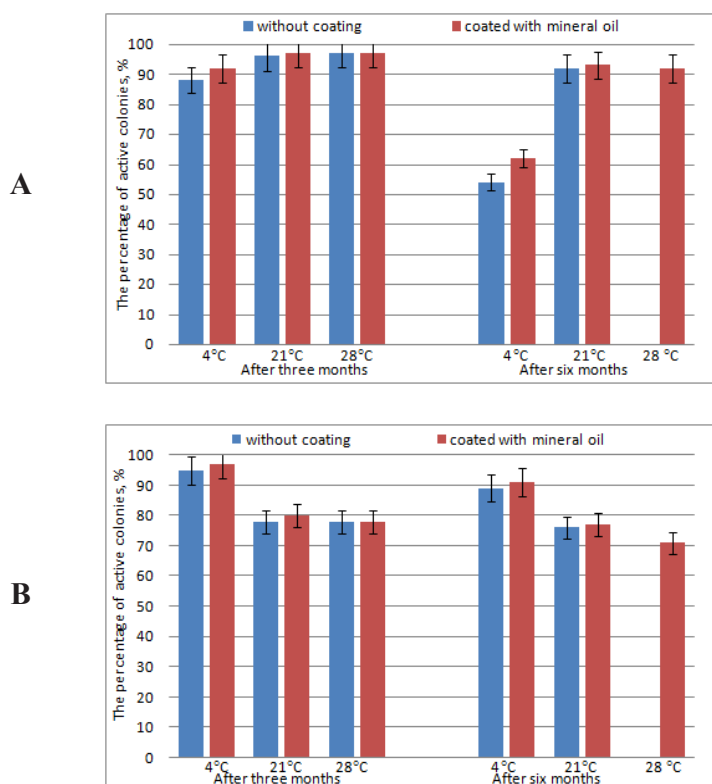


Fig. 3. The percentage of active colonies of strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 (A) and *S. globisporus* 7Crt (B) during storage

As a result of the studies, it was noted the absence of a fundamental difference in results of storage «without» and «with a protective coating», except for slants at t 28 °C. The cultures were drying up completely on the slant surface at t 28 °C after 6 months of storage without the use of mineral oil. Also, the variability of carotenoids



producers *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt differed depending on storage temperatures. The most negative index at t 4°C during 6 months of storage was for strain *S. globisporus* 4Lcp-Hp7. The percentage of productive/active colonies from strain *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 at t 4 °C was 90+7% and 58+6% for 3 and 6 months of storage, respectively. The cleavage of the strain *S. globisporus* 7Crt at t 4 °C was a lower, 96+4% 89+3% after 3 and 6 months storage, respectively.

The variability of the trait of carotenoids biosynthesis of strain *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 at t 21 °C and 28 °C was slightly lower than at 4 °C. Active colonies in populations of strains were 90%, whereas the number of same colonies at high temperatures from *S. globisporus* 7Crt has varied in a range of 70–80%. That is, a room temperature of 21 °C is permissible for storage of the strain *S. globisporus* 4Lcp-Hp7. In the literature it is noted the data of storage of carotenoids producers at high temperatures, for example for *Blakeslea trispora* [2].

After storage, carotenoid-synthetic mutants have been transferring to slants with optimal medium for producers several times with weekly intervals [9, 13]. Frequent transferring of subcultures contributes to the stabilization of carotenoid biosynthesis. One of the reasons for the accumulation of non-productive variants at the long-time storage can be the exhaustion of medium components necessary for the formation of carotenoids. Therefore, the variability of carotenoids producers during storage for 6 months was higher than in the course of 3 ones.

The variability of lyophilized cultures S. globisporus 4Lcp-Hp7 and S. globisporus 7Crt. The ampoules of lyophilized samples were left to stand for 1 hour with distilled water as in standard methods [5]. In this case, cultures by microcolonies was germinating for 7–10 days on agar- medium in Petri dishes, whereas by a rule, their growth can be observed on the second day of growing. Therefore, lyophilized cultures were cultured in liquid medium for 2 hours to adaptation. The survival of lyophilized cultures for 1-year storage has not decreased, although cleavage of researched strains was huge. The percentage of colonies with biosynthesis of corresponding carotenoids from strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt were 52+2% and 66+2%, respectively. It is known that lyophilization processes have an effect on the viability and enzymatic properties of microorganisms [5]. High indexes of variability of lyophilized cultures of carotenoids producers can be the result of inhibition of carotenoids biosynthetic enzymes in the processes of lyophilization.

The variability of non-active variants of researched strains. The study of the variability of inactive variants has been carried out in order to exclude modification. Arbitrary variants from bacteria populations of researched strains were selected for the analysis. The appearance of colored colonies from colorless ones was not observed among thousands checked for both strains. Productive colonies were not accumulating in bacteria populations low-active colonies (cream and yellow) among thousands checked at pH 6-7 but were watched at pH 8. The frequency of appearance of pink and orange colonies from low-active variants of researched strains was 10^{-2} for both ones (Fig. 4). Also, the colonies with lycopene biosynthesis (pink) were accumulating in the bacteria population of low-active variants of strain *S. globisporus* 7Crt with the frequency of 10^{-1} . The pH level of the medium has stimulated their formation. It is known the lycopene is a precursor of beta-carotene.



The beta-carotene biosynthetic enzyme (lycopene cyclase) at pH8 is inhibited and does not create beta-carotene from lycopene, which contributes to the accumulation of last one. The biotechnological method as the change of the pH level is using to accumulate lycopene in fungi [3].

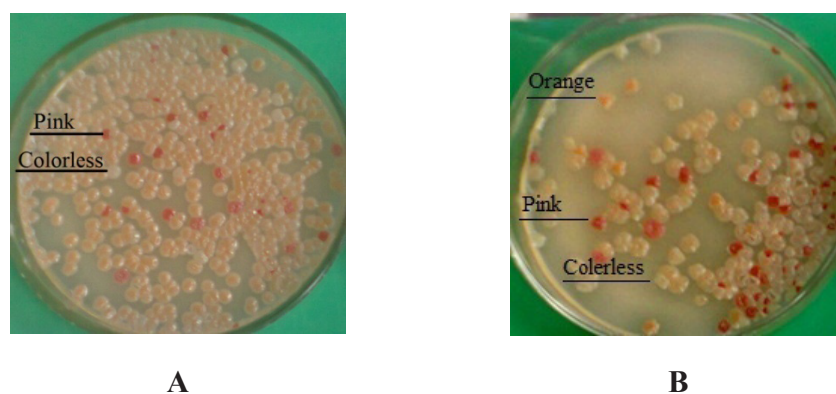


Fig. 4 The cleavage of low-activity colonies of strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 (A) and *S. globisporus* 7Crt (B), pH 8.0

Today, *crt*-genes for some *Streptomyces* have been registered in the bioinformational databases GenBank, KEGG, and the others. The expression of *crt*-genes in *S. setonii* and *S. griseus* IFO13350 is controlled by the *crtS* gene, the product of which is a stress-sensitive sigma-like factor. Expression of *crt*-genes in *S. coelicolor* A3 (2) is controlled by a photosensitive cluster of *lit*-genes. The products of genes *crtS* and *litS* initiate the transcription of *crt*-operon in these *Streptomyces* [7, 8, 14].

According to the literature, amount of carotenoids accumulation for the most *Streptomyces* are very low and are measured in $\mu\text{g/L}$. The exception is the strain *S. rimosus*, which synthesizes lycopene 230 mg/L [15]. The yield of carotenoids from mutant strains *S. globisporus* is lower than from *S. rimosus*. Their productivity depend on the stability of inheritance of carotenoids biosynthesis. The stability of a feature of the carotenoids biosynthesis, in turn, depends on the components of medium, temperature, pH and storage conditions. On the other hand, the cause of strains variability with carotenoids biosynthesis is considered to be the localization of a cluster of *crt*-genes in the regions of terminal inverted repeats (TIR) of chromosome, which leads to increased mutagenicity and elimination of gene [10, 12, 14]. Also, the formation of *Streptomyces* colonies after homogenization is the result of random breaks of mycelium, which increases the likelihood of creating a colony with different genetic material. This, in turn, affects the composition of the synthesized metabolites in separated colonies. Also, according to the latest data of regulation of interactions in microorganisms [11, 17], the accumulation of non-active colonies may even be necessary to support the variants with carotenoids biosynthesis.

It has been shown, that the trait of carotenoids biosynthesis in the mutant strains *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 and *S. globisporus* 7Crt was showing variability



with high frequency after deep cultivation (10^{-3} and 10^{-2} non-active colonies) and during long storage on slants and in lyophilized state (10–50%).

**С. Л. Голембиовская, Т. В. Дворник, Л. В. Полищук,
Б. П. Мацелюх**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
154, ул. Академика Заболотного, Киев, Украина, 03680,
тел.: +38 (044) 522 67 62

ИЗМЕНЧИВОСТЬ КАРОТИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ ШТАММОВ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912 ПОСЛЕ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Реферат

Цель. Определить изменчивость признака биосинтеза каротиноидов у двух мутантных штаммов *Streptomyces globisporus* 1912 в условиях глубинного выращивания и после хранения. **Актуальность.** Изучение спонтанной изменчивости штаммов-продуцентов каротиноидов после глубинного культивирования и длительного хранения необходимо для понимания механизмов внутривидового наследования и возможности их контроля. **Методы.** Визуальный анализ фенотипа колоний стрептомицетов, статистический анализ проводили с помощью Windows Software Excel 2007. **Результаты.** Появление непродуктивных/неактивных вариантов в популяциях штаммов *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 и *S. globisporus* 7Crt после выращивания в жидкой кукурузно-соевой среде составляло 10^{-3} и 10^{-2} , что на 1–2 порядка выше их стандартного расщепления при частых пересевах субкультур. Изменчивость изучаемого признака в результате хранения зависела от температуры. Непродуктивные варианты у штаммов *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 и *S. globisporus* 7Crt при температуре хранения 4°C составляли около 50% и 10% популяции, соответственно. При температурах хранения 21 °C и 28 °C у популяции штамма *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 таковых накапливалось до 10%, тогда как у штамма *S. globisporus* 7Crt – 20–30%. После года хранения около 52% и 66% колоний популяции лиофилизированных культур *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 и *S. globisporus* 7Crt поддерживали высокий уровень синтеза соответствующих каротиноидов. **Выводы.** Установлено, что признак биосинтеза каротиноидов у мутантных штаммов *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 и *S. globisporus* 7Crt проявляет изменчивость с высокой частотой как после глубинного культивирования (10^{-3} и 10^{-2} неактивных колоний), так и после длительного хранения на косяках и в лиофилизированном состоянии (10–50%).

Ключевые слова: *Streptomyces*, биосинтез каротиноидов, изменчивость, хранение.



С. Л. Голембіовська, Т. В. Дворник, Л. В. Поліщук,
Б. П. Мацелюх

Інститут мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,
154, вул. Академіка Заболотного, Київ, Україна, 03680,
тел.: +38 (044) 522 67 62

МІНЛИВІСТЬ КАРОТИНСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ШТАМІВ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912 ПІСЛЯ ГЛИБИННОГО ВИРОЩУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ

Реферат

Мета. Визначити мінливість ознаки біосинтезу каротиноїдів у двох мутантних штамів *Streptomyces globisporus* 1912 в умовах глибинного вирощування та після зберігання. **Актуальність.** Вивчення спонтанної мінливості штамів-продуцентів каротиноїдів після глибинного культивування та довготривалого зберігання необхідно для розуміння внутрішньопопуляційних механізмів успадкування та можливості їхнього контролю. **Методи.** Візуальний аналіз фенотипу колоній стрептоміцетів, статистичний аналіз проводили з використанням Windows Software Excel 2007. **Результати.** Поява непродуктивних/неактивних варіантів у популяціях штамів *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 і *S. globisporus* 7Crt після вирощування в рідкому кукурудзяно-соєвому середовищі становила 10^{-3} та 10^{-2} , що на 1–2 порядки вище за їх стандартне розщеплення при частому перевиванні субкультур. Мінливість досліджуваної ознаки в результаті зберігання залежала від температури. Непродуктивні варіанти штамів *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 і *S. globisporus* 7Crt при температурі зберігання 4 °C становили біля 50% і 10% популяції, відповідно. За температурах зберігання 21°C та 28 °C в популяції штаму *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 таких накопичувалося до 10%, в той час як у штаму *S. globisporus* 7Crt – 20–30%. Після року зберігання біля 52% та 66% колоній популяції ліофілізованих культур *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 та *S. globisporus* 7Crt підтримували високий рівень синтезу відповідних каротиноїдів. **Висновки.** Встановлено, що ознака біосинтезу каротиноїдів у мутантних штамів *S. globisporus* 4Lcp-Hp7 та *S. globisporus* 7Crt проявляє мінливість з високою частотою як після глибинного культивування (10^{-3} та 10^{-2} неактивних колоній), так і після довготривалого зберігання на скошених агаризованих поверхнях та у ліофілізованому стані (10–50%).

Ключевые слова: *Streptomyces*, биосинтез каротиноидов, изменчивость, хранение.

References

1. Anatsky AS, Kunshchikova YA. Influence of aeration degree of cultural liquid on biosintetical activity of fungus culture *Blakeslea trispora*. Visnyk of Dnipropetrovsk University. 2009; 17(2):15–194. (in Ukrainian)
2. Bondarj YV, Sannykova VM, Ghryshhenko NA, Stuzhuk GhM. Dependence of the carotene-synthetic activity of the culture *Blakeslea trispora* from storage conditions. Biotechnology. 1985; 4:47-48. (in Russian)
3. Feofilova EP. Carotenoids of fungi: biological functions and practical use.



Applied Biochemistry and Microbiology. 2004; 30:181–196. (in Russian)

4. Gholembiovsjka SL, Dvornyk TV, Lavrenchuk VJa, Matselyukh BP. Carrying carotenoid biomass of *Streptomyces* in ration of oviparous hens. Veterinary Medicine. 2014; 99: 119-122. (in Ukrainian)

5. Gholovach TN, Pidghorsjkyj VS, Sudenko VI, Ghroma LI. Deposit and storage of innovative microorganisms: Method. Recommendations. Kyiv: Society "Knowledge" of Ukraine. 2004 – 108 p. (in Ukrainian)

6. HOLEMBIOVS'KA SL, MATSELYUKH BP. Spontaneous and induced variability of carotenoid biosynthesis characteristics in *Streptomyces globisporus* 1912. Mikrobiol. Z. 2008; 70(6):18–23. (in Ukrainian)

7. Kato F., Hino T., Nakaji A., Tanaka M., Koyama Y. Carotenoid synthesis in *Streptomyces setonii* ISP5395 is induced by the gene crtS, whose product is similar to a sigma factor. Mol. Gen. Genet. 1995; 247(10):387–390.

8. Lee H-S., Ohnishi Y, Horinouchi S. A sigmaB-like factor responsible for carotenoid biosynthesis in *Streptomyces griseus*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2001; 3(1): 95–101.

9. Matselyukh B, Matselyukh D, Golembiovska S, Polishchuk L, Lavrinchuk V. Isolation of *Streptomyces globisporus* and *Blakeslea trispora* mutants with increased carotenoid content. Mikrobiol. Z. 2013; 75(6):10–16.

10. Matselyukh BP, Polishchuk LV, Lukyanchuk VV. Golembiovska SL, Lavrenchuk VYa. Molecular mechanism of the carotenoid biosynthesis activation in the producer *Streptomyces globisporus* 1912. Biotechnol. Acta. 2014; 7(6):69–74.

11. McCormick J, Fłdrdh K. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. FEMS Microbiol. Rev. 2012; 36(1): 206–231.

12. Myronovskyi M, Tokovenko B, Brotz E, Ruckert C, Kalinowski J, Luzhetskyy A. Genome rearrangements of *Streptomyces albus* J1074 lead to the carotenoid gene cluster activation. Appl Microbiol Biotechnol. 2014; 98(2):795–806.

13. Polishchuk LV, Golembiovska SL, Matselyukh BP, Lukyanchuk VV. Genetic Variability of Synthesis Feature of Carotenoids in *Streptomyces globisporus* 1912. Mikrobiol. Z. 2013; 75(5):40–46.

14. Takano H. The regulatory mechanism underlying light-inducible production of carotenoids in nonphototrophic bacteria. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2016; 80(7): 1264–1273.

15. Wang M, Yang H, Gao Jun-lian, Ma Rong-cai. Breeding of high-yield lycopene producing strains of *Streptomyces rimosus* and studies on its flask culture conditions. China Biotechnology. 2009; 12:13.

16. Wang W, Yu L. Effects of oxygen supply on growth and carotenoids accumulation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Z. Naturforsch. 2009; 64:853–858.

17. Ye Xu., Kalin Vetsigian. Phenotypic variability and community interactions of germinating *Streptomyces* spores. Microbial ecology. 2017; 7(1):699.

Стаття надійшла до редакції 25.06.2018 р.



**N. V. Limanska, N. V. Sokolova, A. A. Sudak,
M. B. Galkin, V. O. Ivanytsia**

Odesa National I. I. Mechnykov University,
2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: limanska@gmail.com

EFFECT OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ON GROWTH CHARACTERISTICS OF WHEAT IN HYDROPONICS AND SOIL

The aim was to study the effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and some growth characteristics of wheat *Triticum aestivum* L. in hydroponics and soil under greenhouse and field conditions. **Materials and Methods.** Strains of *L. plantarum*, their mixtures in a ratio 1:1 had been prepared immediately before the experiment, as well as mixed cultures of these strains which had been cultivated together for at least one week and re-inoculated every two days were used. Before grounding, seeds were inoculated with lactobacilli (in concentrations 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%, 0.00001%) for an hour. Seed germination, length of the roots and height of the seedlings were calculated as means with standard errors or confidential intervals. **Results.** Treatment of wheat seeds with individual *L. plantarum* ONU 12, *L. plantarum* ONU 311, *L. plantarum* ONU 355 strains, their mixed cultures grown together and mixtures has increased seed germination in 6.0–40.0% depending on the conditions of germination and inoculum concentration. Under conditions of hydroponics and soil in the greenhouse the best results were shown by inoculums in concentration 10³–10⁶ CFU/ml, and under field conditions – in concentration 10²–10⁴ CFU/ml. Mixtures and mixed cultures of *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 311 and *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 355 formed developed biofilms on roots of wheat seedlings. Mean height of seedlings increased in 8.0–41.0%, and the length of the roots increased by 2.4 times in hydroponics and in 6.8–64.5% in soil. **Conclusion.** The mixtures and mixed cultures of bacteria *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 311 and *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 355 could stimulate wheat germination and growth and can be used for development of plant growth promoting bacterial preparations.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, biofilm, inoculum, wheat, growth characteristics, hydroponics.

Modern agriculture experiences the increasing need for environmentally friendly biological preparations. Lactic acid bacteria, in particular lactobacilli, are famous for a wide range of antagonistic properties [1; 5; 9; 11; 16], as well as their ability to stimulate plant growth [3; 4; 8; 13; 15] due to the synthesis of hormones or precursors of growth-promoting hormones [7].

In particular, wheat growth stimulation with the help of biological preparations



might be possible not only in field conditions, but also in hydroponics, including the future possibility of cultivating wheat in artificial conditions, including space stations [12; 14].

Previous studies conducted on wheat seedlings in moist chambers, demonstrated high stimulatory effect of *L. plantarum* strains on germination and growth characteristics of seedlings [3], however further investigations under conditions more close to natural were needed.

The aim of this work was to study the effect of bacteria *L. plantarum* on germination and some growth characteristics of wheat *Triticum aestivum* L. in hydroponics and soil under greenhouse and field conditions.

Materials and Methods

In this investigation, stimulatory activity of the next bacterial strains from the collection of the Department of Microbiology, Virology and Biotechnology of Odesa National I. I. Mechnykov University (ONU) was studied: *L. plantarum* ONU 12, *L. plantarum* ONU 311, *L. plantarum* ONU 355; a mixture of strains *L. plantarum* ONU 12, *L. plantarum* ONU 311, *L. plantarum* ONU 12, *L. plantarum* ONU 355 and mixed cultures of *L. plantarum* ONU 12, *L. plantarum* ONU 355 and *L. plantarum* ONU 12, *L. plantarum* ONU 311. All *L. plantarum* strains were originally isolated from grapes and stored at -80°C in 20% glycerol.

Lactobacilli were grown for 24 hours in a liquid MRS medium [6] at 37°C . Daily cultures of lactobacilli at the concentration of 10^8 CFU/ml were used to prepare the dilutions: 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%, 0.00001%.

A mixture of strains was created by mixing the overnight cultures of different strains of lactobacilli in a ratio 1:1 and immediately used in the experiment (for dilutions and treatment).

A mixed culture of lactobacilli was created by mixing the overnight cultures of different strains of lactobacilli in a ratio 1:1 and cultivating them together for a week with re-inoculation every two days. For the experiment, a mixed culture was grown overnight to reach the concentration of 10^8 CFU/ml.

The conditions of hydroponics were modeled using Aquasave S. gel. The test plant used in the research was wheat *Triticum aestivum* L., variety Odeska ozyma. Prior to the experiments, the seed surface was sterilized with 25% hydrogen peroxide during one minute, and washed thrice in sterile distilled water (SDW).

In all the experiments, the seeds were soaked in prepared bacterial suspensions or SDW for 60 minutes.

In the experiments with hydroponics, seeds were later transferred to germinate on Aquasave S gel in glassware. The control group were seeds soaked for 60 min in SDW. Germination was carried out in a greenhouse in Aquasave S gel for the period of seven days.

In the experiments with soil in a greenhouse, commercial soil "Poliskyi Universalnyi" with high content of peat was used; the soil was not sterilized before sowing. Wheat seeds were similarly soaked in bacterial suspensions for one hour and then sowed in plastic cups with soil.

The experiments in the open field were conducted in the south-Ukrainian heavy-bodied low-humus chernozem soil during 2017 and 2018.



In total, three independent experiments of each variant using 240–300 seeds were conducted. After seven days, the growth characteristics of seedlings were measured, namely - mean root length of seedlings and mean seedlings height [2]. Statistical analysis was carried out using the Excel package. The lengths of roots and seedlings were, as quantitative characteristics, expressed as a mean with 95% confidence interval; seed germination was, as a qualitative characteristic, expressed in percentage with the standard error. Significant differences between measurements of control and inoculated seedlings were identified in Student's t-test ($P < 0.05$).

In order to study the ability of bacteria to form biofilms on plant root surface, the seven-day seedlings were washed from gel and soil in distilled water. The biofilm was fixed in 96% ethanol for 15 minutes and stained with 0.1% Acridine Orange solution for 10 minutes. Dyed seedlings were dried on a microscope slide and observed using PrimoStar PC microscope, Carl Zeiss, with x 600 magnification. Microscopy was performed on 10 samples of each variant, with 10 visual fields of each. The biofilms were photographed using Canon EOS 500D camera.

Results and Discussion

The observations of wheat seed germination showed that individual strains of lactobacilli and their mixtures in most cases caused positive effect on germination, increasing the percent of germinated seeds in 6.0–40.0% (Table).

Under greenhouse conditions (both in hydroponics and soil), the effect of seed treatment with lactobacilli was higher due to absence of any additional nutrients in gels and peat soils used for germination of seeds. Metabolites of lactobacilli, dead cells, and residues of the culture medium in which bacteria were cultivated played the role of organic component of the germination substrate.

Stable increasing in germination following treatment with bacteria at all concentrations was observed using the mixtures and mixed cultures of lactobacilli. Consequently, the best combinations were selected and used for the open field experiments – the mixtures of strains *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 311 and *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 355.

In the open field, seed germination in control was higher (22%) than in gel and in peat soil under greenhouse conditions. This is due to the rich composition of organic and inorganic components of the south-Ukrainian heavy-bodied low-humus chernozem of the Odesa region. However, the treatment of seeds with lactobacilli also increased germination in 6–8%. The best concentrations were 0.1–0.01% for *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 311 and 1.0–0.01% for *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 355.

Inoculation with mixtures and mixed cultures of lactobacilli also improved some morphometric characteristics of seedlings in gel. There was a significant increase in mean height of seedlings – following treatment with a mixed culture and a mixture of strains *L. plantarum* ONU 12 + 311 in 37.0–38.1%, and by combinations *L. plantarum* ONU 12 + 355 – in 36.2–41.0% (Fig. 1).

The length of roots of wheat seedlings was the highest as a result of treatment with mixed culture ONU 12 + 311, which yielded 34.1% increase compared to the control, and mixed culture *L. plantarum* ONU 12 + 355 – 2,4-fold increase (Fig. 2).



Table

Germination of wheat seeds following treatment with individual strains of *L. plantarum* and their combinations (data estimated as %)

Conditions of planting	Strain	Final concentration of overnight cultures of lactobacilli				
		1%	0.1%	0.01%	0.001%	0.0001%
Hydroponics	ONU 12	60.0±2.5	80.0±2.1*	70.0±2.4*	60.0±2.5	60.0±2.5
	ONU 311	78.0±2.1*	90.0±1.5*	90.0±1.5*	90.0±1.5*	60.0±2.5
	ONU 355	87.0±1.5*	60.0±2.5	70.0±2.4*	60.0±2.5	80.0±2.1*
	12+311 mixture	70.0±2.4*	100*	90.0±1.5*	80.0±2.1*	75.0±2.4*
	12+355 mixture	90.0±1.5*	70.0±2.4*	80.0±2.1*	80.0±2.1*	90.0±1.5*
	12+311 mixed culture	80.0±2.1	80.0±2.1*	70.0±2.4*	80.0±2.1*	78.0±2.1*
	12+355 mixed culture	80.0±2.1*	80.0±4.4*	80.0±4.4*	70.0±2.4*	78.0±2.1*
	control	60.0±2.5				
Soil under greenhouse conditions	ONU 12	75.0±3.0*	70.0±3.2*	72.0±2.3*	85.0±3.4*	75.0±1.2*
	ONU 311	80.0±2.4*	85.0±1.1*	81.0±1.8*	82.0±3.1*	80.0±4.1*
	ONU 355	65.0±2.2	68.0±1.6	62.0±2.4	75.0±3.0*	78.0±1.2*
	12+311 mixture	75.0±1.5*	78.0±5.1*	76.0±2.2*	80.0±2.8*	86.0±4.3*
	12+355 mixture	67.0±2.2	77.0±1.7*	86.0±2.4*	74.0±3.1*	88.0±1.5*
	12+311 mixed culture	68.0±3.1	80.0±2.1*	72.0±3.8*	69.0±4.3	75.0±1.4*
	12+355 mixed culture	70.0±2.7*	66.0±2.3	71.0±2.4*	82.0±1.3*	88.0±2.6*
	control	60.0±3.4				
Open field	12+311 mixture	84.0±3.2	92.0±1.2*	88.0±1.4*	84.0±1.6	82.0±2.8
	12+355 mixture	90.0±1.1*	90.0±2.6*	92.0±3.1*	86.0±2.2	84.0±1.9
	control	82.0±1.2				

Note: * values are significantly different from the control ones ($P < 0.05$).



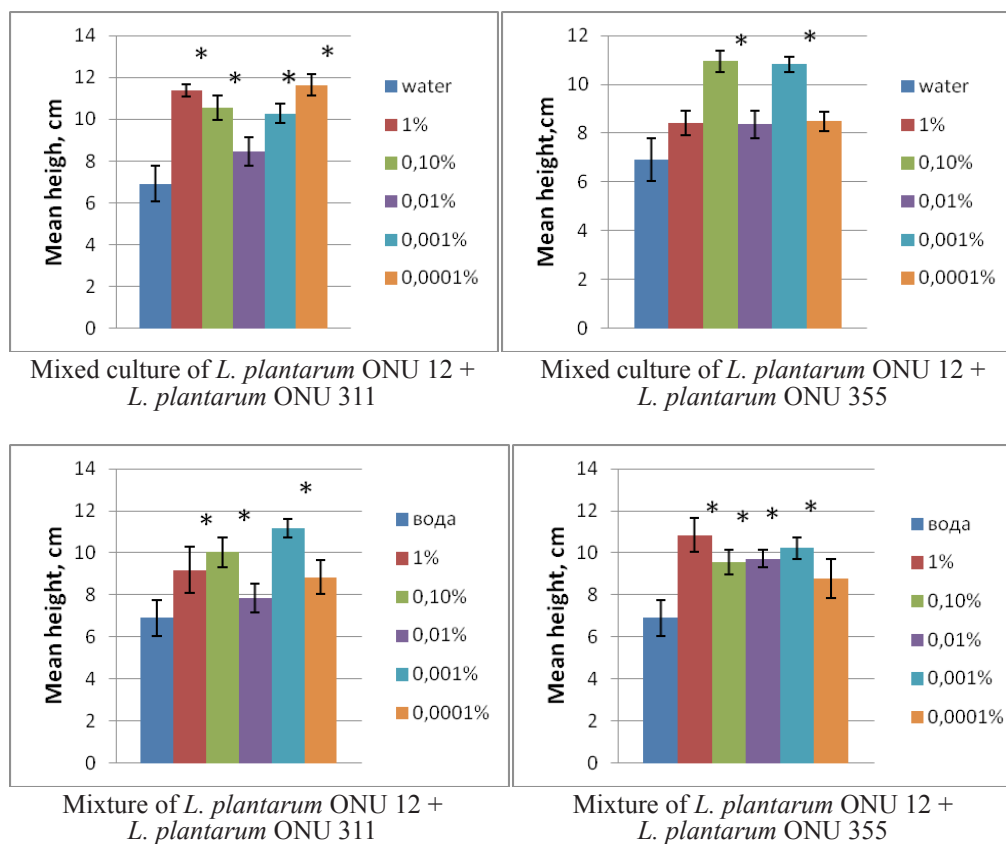


Fig. 1. Mean height of wheat seedlings following treatment with mixtures and mixed cultures of lactobacilli in gel: * values are significantly different from the control ones (P < 0.05)

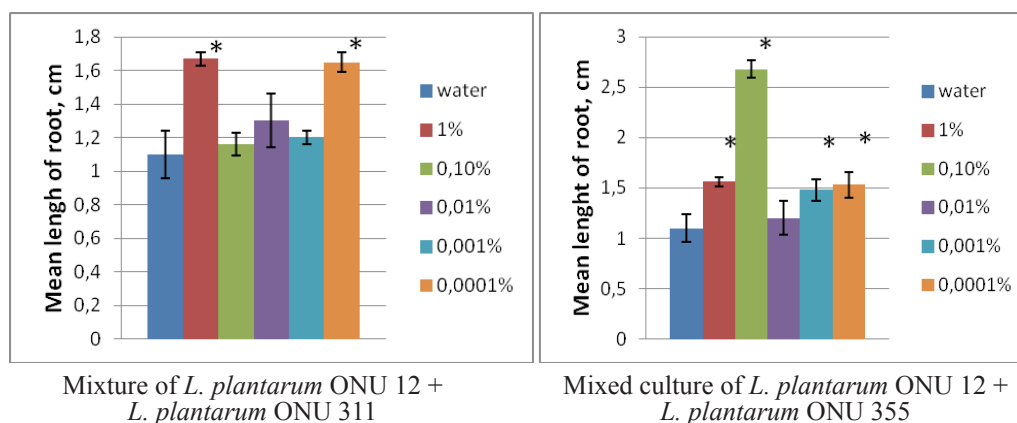


Fig. 2. Mean root length of wheat seedlings following treatment with mixtures and mixed cultures of lactobacilli in gel: * values are significantly different from the control ones (P < 0.05)



Overall, different strains of lactobacilli and their combinations positively influenced the growth of wheat seedlings in gel, causing increase in seedlings height in 36.2–41.0%, and the mean length of the roots increased in 2.4 times. As a rule, the best effect was observed at the concentration of 1.0–0.001%, that is, bacterial suspensions with 10^6 – 10^3 CFU/ml.

In peat soil under greenhouse conditions, the mean length of seedlings after the treatment with the mixture of strains *L. plantarum* ONU 12 + 311 increased in 8.4–20.4%, with mixed culture of *L. plantarum* ONU 12 + 311 – in 6.8–15.9%, with mixed culture of *L. plantarum* ONU 12 + 355 – in 4.6–17.6% (Fig. 3). For the mixed culture of *L. plantarum* ONU 12 + 355 dilutions in the range of 0.001–0.0001% (10^3 – 10^2 CFU/ml) yielded better results, and mixed culture of *L. plantarum* ONU 12 + 311 at all concentrations increased the mean root length. In case of mixtures, the results varied depending on both the combination of lactobacilli and their concentration (Fig. 3).

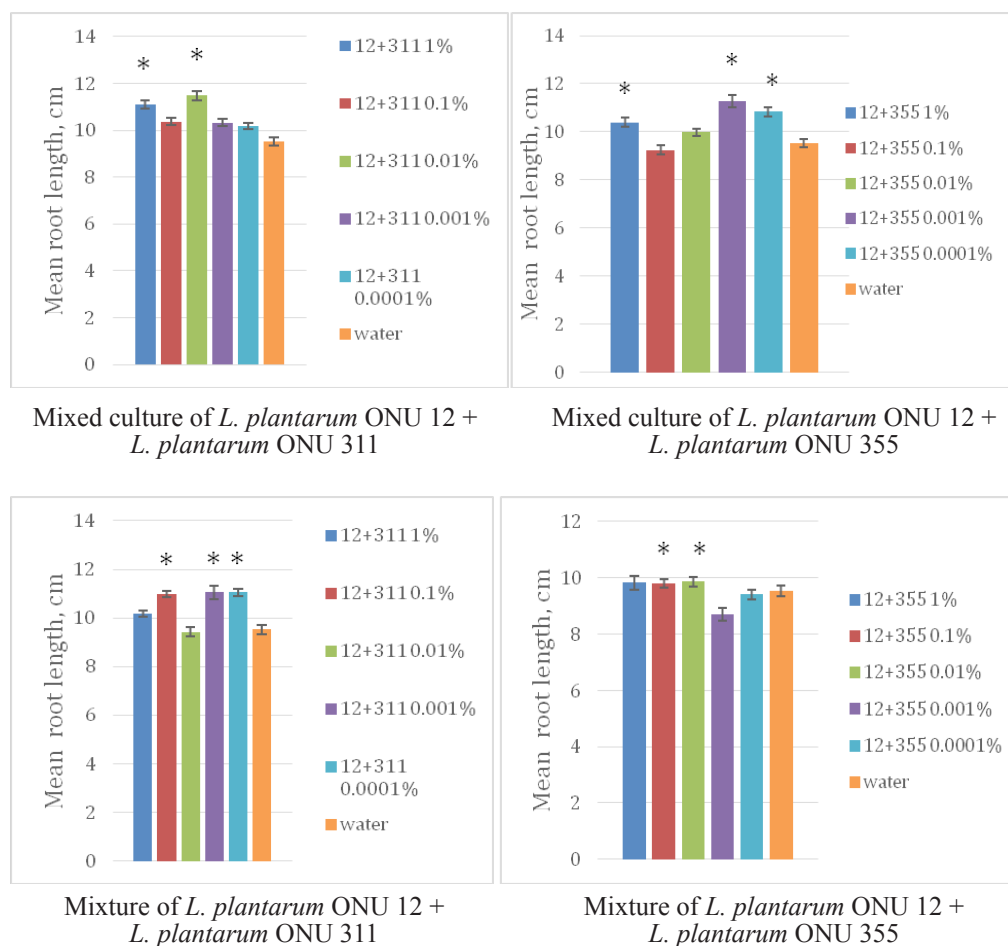


Fig. 3. Mean root length of wheat seedlings following treatment with the mixtures and mixed cultures of lactobacilli in soil under greenhouse conditions: * values are significantly different from the control ones (P < 0.05)

Treatment with bacterial suspensions also had a significant effect on average seedlings height (Fig. 4).

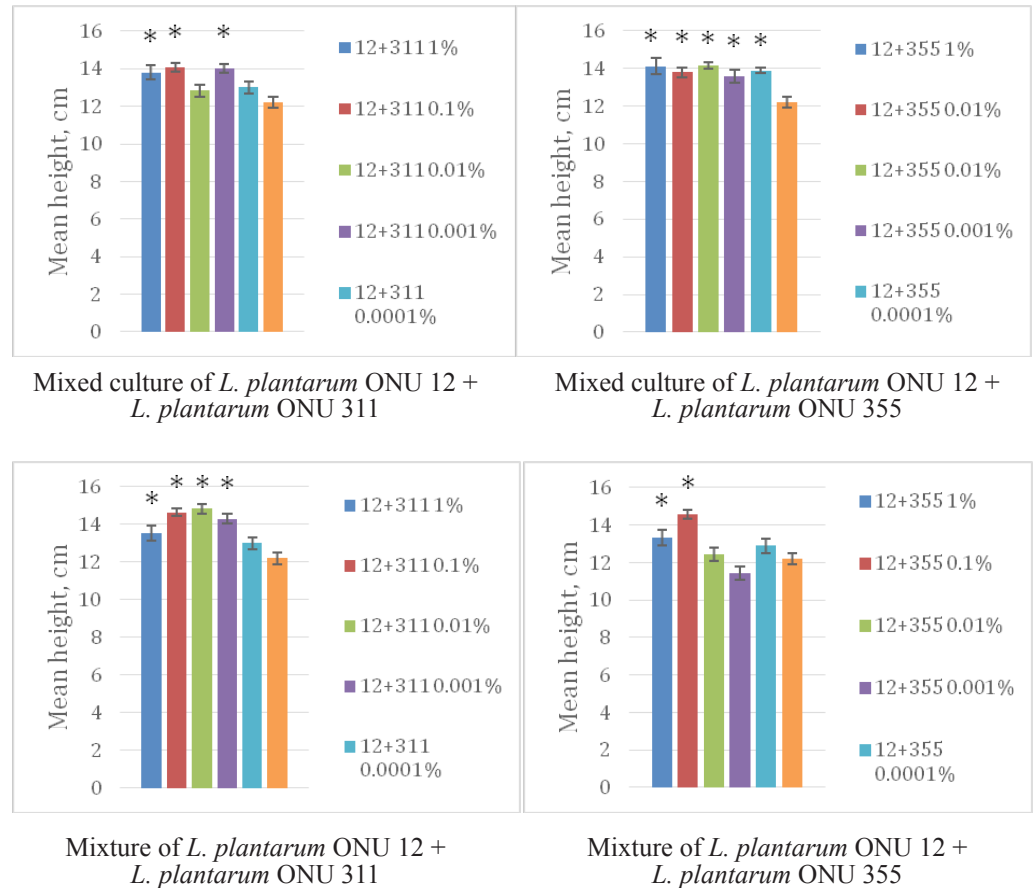


Fig. 4. Mean height of wheat seedlings following treatment with mixtures and mixed cultures of lactobacilli in soil under greenhouse conditions: * values are significantly different from the control ones (P < 0.05)

Treatment with the mixture and mixed culture of *L. plantarum* ONU 12 + 311 increased the mean seedlings height in 6.6 – 21.5%, and inoculation of seeds with the mixture of strains *L. plantarum* ONU 12 + 355 yielded a 12.0–22.8% increase (Fig. 4). The highest values were observed at concentrations 1.0–0.01% (from 10⁶ to 10⁴ CFU/ml).

In the open field, the influence of lactobacilli was slightly different, namely - while all concentrations of both mixtures positively influenced the mean root length (Fig. 5), mixture of *L. plantarum* ONU 12 + 311 at the concentration of 1% had an inhibitory effect on the seedlings height (Fig. 6).

This fact probably could be explained by overproduction of phytohormones by the mixture of lactobacilli strains in soil and direct interaction with soil microbiota. Other concentrations of inoculums increased the average height of seedlings in



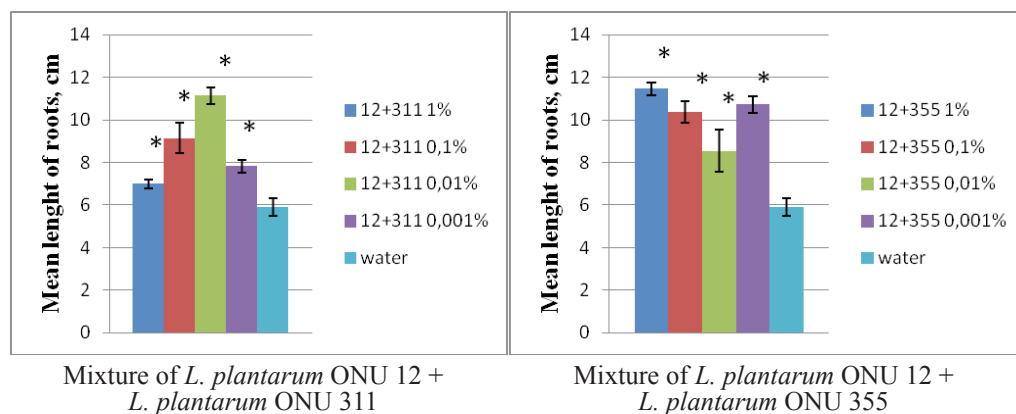


Fig. 5. Mean root length of wheat seedlings following treatment with the mixtures and mixed cultures of lactobacilli in the open field: * values are significantly different from the control ones ($P < 0.05$).

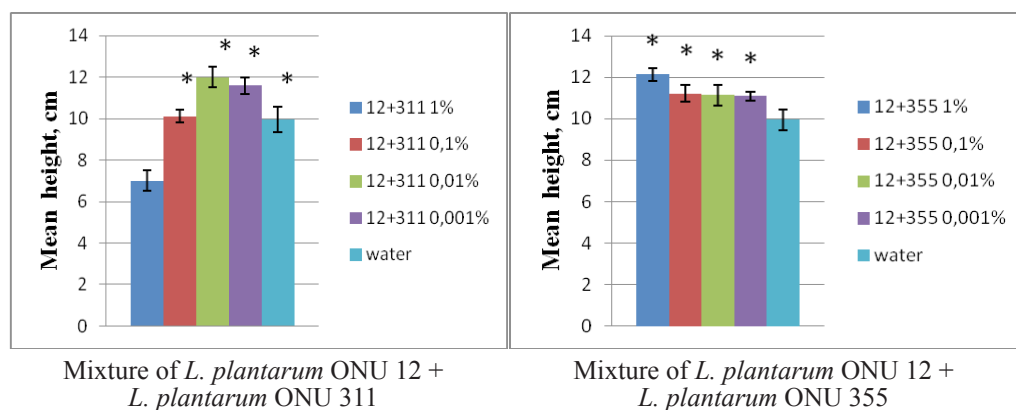


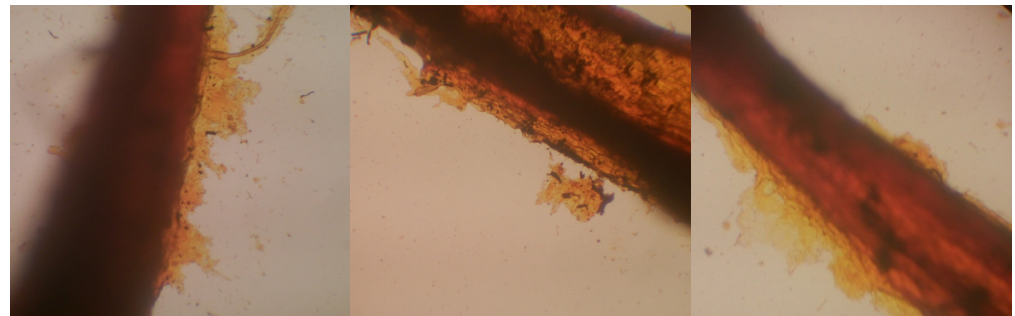
Fig. 6. Mean height of wheat seedlings following treatment with the mixtures and mixed cultures of lactobacilli in the open field: * values are significantly different from the control ones ($P < 0.05$).

8.0–17.9%, and the length of the roots – in 15.7–64.5% with the best concentrations ranging from 0.1–0.001% (10^4 – 10^2 CFU/ml) (Fig. 6).

In general, the obtained data indicate that, in order to improve growth characteristics of wheat seedlings in the open field, lower concentrations of lactobacilli suspensions are sufficient than for greenhouse conditions and hydroponics.

The bacteria of both mixed cultures of *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 355 and *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 311 were able to form biofilms on roots of wheat seedlings. The biofilms consisted of well-developed microcolonies and matrix, lacked gaps and occasionally had slight ruptures (Fig. 7).

The results obtained from using mixed cultures of *L. plantarum* strains ONU 12 + *L. plantarum* ONU 355 and *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 311



A

B

C

Fig. 7. Colonization of roots of the seedlings by mixed cultures of *L. plantarum* ONU 12+311 (A) and *L. plantarum* ONU 12+355 (B, C) (x600)

for treatment of wheat seeds indicate that one hour is sufficient time for lactobacilli to attach to seeds and consequently colonize the seed surface.

High increase in morphological characteristics of plants indicates the stimulatory potential of the studied strains of lactobacilli, which could be explained by the synthesis of auxin hormones or their precursors, as described in the literature [7].

Treatment with lactobacilli improved germination of wheat seeds in 10.0–40.0% in hydroponics and in soil under greenhouse conditions, and in 6.0–8.0% in the open field. Under the influence of the mixtures of *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 311 and *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 355, mean height of seedlings increased in 34.2–41.0% in hydroponics, in 6.6–22.8% in soil under greenhouse conditions, and in 8.0–17.9% in the open field. Following treatment with lactobacilli, the increase in mean root length of wheat seedlings ranged from 34.1% to 2.4 times in hydroponics, from 6.8 to 20.4% in soil under greenhouse conditions, and from 15.7 to 64.5% in the open field. The best concentrations of bacterial mixtures for seed treatment with subsequent germination in hydroponics and soil were 10^3 – 10^6 CFU/ml, and for open field conditions – 10^2 – 10^4 CFU/ml. Bacteria of *L. plantarum* mixture of ONU 12 + *L. plantarum* of ONU 311 and *L. plantarum* of ONU 12 + *L. plantarum* of ONU 355 formed developed biofilm on roots of wheat seedlings. Thus, for stimulation of wheat growth mixtures *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 311 and *L. plantarum* ONU 12 + *L. plantarum* ONU 355 should be used with the best concentrations of bacterial mixtures for seed treatment with subsequent germination in hydroponics and soil 10^3 – 10^6 CFU/ml, and for open field conditions – 10^2 – 10^4 CFU/ml.



**Н. В. Ліманська, Н. В. Соколова, А. А. Судак,
М. Б. Галкін, В. О. Іваниця**

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

ВПЛИВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* НА РІСТ ПШЕНИЦІ НА ГІДРОПОНІЦІ ТА У ҐРУНТІ

Реферат

Мета. Вивчити вплив *L. plantarum* на проростання і деякі ростові характеристики пшениці *Triticum aestivum* L. в умовах гідропоніки, ґрунту у теплиці та відкритого ґрунту. **Методи.** Використовували окремі штами *L. plantarum*, їх суміші у співвідношенні 1:1, приготовлені безпосередньо перед експериментом, а також змішані культури бактерій цих штамів, які культивували разом щонайменше протягом тижня з пересівами кожні два дні. Насіння перед висівом інокулювали різними розведеннями добових культур лактобацил (1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001%, 0,00001%) впродовж години. Розраховували середні значення, стандартні похибки або довірчі інтервали таких показників, як схожість насіння, довжина коренів та висота паростків. **Результати.** За обробки бактеріями окремих штамів *L. plantarum* ОНУ 12, *L. plantarum* ОНУ 311, *L. plantarum* ОНУ 355, їх змішаними культурами та сумішами спостерігалось покращення схожості на 6,0–40,0% в залежності від умов пророщування та концентрації інокулюму. Для умов гідропоніки та закритого ґрунту найкращими концентраціями інокулюмів були 10^3 – 10^6 КУО/мл, а для умов відкритого ґрунту – 10^2 – 10^4 КУО/мл. Бактерії сумішей і змішаних культур *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 311 та *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 355 утворювали розвинену біоплівку на коренях сіянцив пшениці. Середня висота паростків збільшувалася на 8,0–41,0%, а довжина коренів – у 2,4 рази у випадку росту на гідропоніці та на 6,8–64,5% в умовах ґрунту. **Висновок.** Бактерії сумішей бактерій *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 311 та *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 355 здатні стимулювати пророщування насіння і ріст рослин пшениці та можуть бути застосовані для розробки рістстимулювальних мікробних препаратів.

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, біоплівка, інокулюм, пшениця, ростові характеристики, гідропоніка.



**Н. В. Лиманская, Н. В. Соколова, А. А.
Судак, Н. Б. Галкин, В. А. Иваниця**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса 65082, Украина,
e-mail: limanska@gmail.com

**ВЛИЯНИЕ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* НА РОСТ
ПШЕНИЦЫ НА ГИДРОПОНИКЕ И В ПОЧВЕ**

Реферат

Цель. Изучить влияние *L. plantarum* на проростание и некоторые ростовые характеристики пшеницы *Triticum aestivum* L. в условиях гидропоники, почвы в теплице и в открытом грунте. **Методы.** Использовали отдельные штаммы *L. plantarum*, их смеси в соотношении 1:1, приготовленные непосредственно перед экспериментом, а также смешанные культуры бактерий этих штаммов, которые культивировали вместе, по меньшей мере неделю с пересевами каждые два дня. Семена перед высевом инокулировали разными разведениями суточных культур лактобацилл (1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001%, 0,00001%) в течение одного часа. Рассчитывали средние значения, стандартные ошибки или доверительные интервалы таких показателей, как всхожесть семян, длина корней и высота проростков. **Результаты.** При обработке бактериями отдельных штаммов *L. plantarum* ОНУ 12, *L. plantarum* ОНУ 311, *L. plantarum* ОНУ 355, их смешанными культурами и смесями, наблюдалось улучшение всхожести на 6,0–40,0% в зависимости от условий проращивания и концентрации инокулюма. Для условий гидропоники и закрытого грунта наилучшими концентрациями инокулюмов были 10^3 – 10^6 КОЕ/мл, а для условий открытого грунта – 10^2 – 10^4 КОЕ/мл. Бактерии смесей и смешанных культур *L. plantarum* ОНУ 12 и *L. plantarum* ОНУ 311, *L. plantarum* ОНУ 12 и *L. plantarum* ОНУ 355 формировали развитую биоплёнку на корнях сеянцев пшеницы. Средняя высота проростков увеличивалась на 8,0–41,0%, а длина корней – в 2,4 раза в случае роста на гидропонике и на 6,8–64,5% в условиях грунта. **Вывод.** Бактерии смесей *L. plantarum* ОНУ 12 и *L. plantarum* ОНУ 311, *L. plantarum* ОНУ 12 и *L. plantarum* ОНУ 355 способны стимулировать прорастание семян и рост растений пшеницы, и быть применены для разработки ростстимулирующих микробных препаратов.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, биоплёнка, инокулюм, пшеница, ростовые характеристики, гидропоника.

References

1. Василюк О. М., Коваленко Н. К., Гармашева І. Л. Антагоністичні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів України // Мікробіологічний журнал. – 2014. – Т. 76, № 3. – С. 24–30.
2. ДСТУ 4138-2002 Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. – К.: Держпоживстандарт України, 2003. – 170 с.
3. Мерліч А. Г., Ліманська Н. В., Жунько І. Д., Бабенко Д. О. Вплив



Lactobacillus plantarum та *Bacillus atrophaeus* на проростання насіння та ріст проростків пшениці // Мікробіологія і біотехнологія – 2017. – № 1. – С. 36–47.

4. Ржевская В. С., Отурина И. П., Теплицкая Л. М. Изучение биологических свойств штаммов молочнокислых бактерий // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского, Серия "Биология, химия". – 2014. – Т. 27, № 1. – С. 145–160.

5. Corsetti A., Gobbetti M., Rossi J., Damiani P. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* // Appl Microbiol Biotechnol. – 1998. – Vol. 50. – P. 253–256.

6. De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J Appl Bacteriol – 1960. – № 23. – P. 130–135.

7. Goffin P., de Bunt B., Giovane M., Leveaue J.H.J., Hoppener-Ogawa S., Teusink B., Hugenholtz J. Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth // Molecular Systems Biology. – 2010. – Vol. 6, № 431. doi: 10.1038/msb.2010.67.

8. Higa T., Kinjo S. Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation. In: Proceedings of 1st Int. Conf. On Kyusei Nature Farming, KhonKaen, Thailand, 1989. – P. 13–16.

9. Hoda A.H., Yomna A.M., Shadia M.A.-A. In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant // Life Science J. – 2011. – Vol. 8. – P. 462–468.

10. Limanska N., Ivanytsia T., Basiul O., Krylova K., Biscola V., Chobert J. M., Haertlé T. Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings // Acta physiologiae plantarum. – 2013. – No. 35, Vol. 5. – P. 1587–1595.

11. Lutz M. P., Michel V., Martinez C., Camps C. Lactic acid bacteria as biocontrol agents of soil-born pathogens. Biological control of fungal and bacterial plant pathogens // IOBC-WPRS Bulletin. – 2012. – Vol. 78. – P. 285–288.

12. Mackowiak C. L., Owens L. P., Hinkle C. R. Continuous hydroponic wheat production using a recirculating system // NASA Technical Memorandum. – NASA Biomedical operations and research office, Kennedy Space Center, Florida, USA, 1989. – 60 p.

13. Narasimha M., Malini M., Savitha J. and Srinivas C. Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* // Pest Management in Horticultural Ecosystems. – 2012. – V. 18, № 1. – P. 60–65.

14. Page V., Feller U. Selection and hydroponic growth of bread wheat cultivars for bioregenerative life support systems // Advances in space research. – 2013. – Vol. 52, № 3. – P. 586–546.

15. Primavesi A. M. Effect of *Lactobacillus* inoculants, organic amendments and mineral elements on yield of onion and field bean // Proc. of 4th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Paris, France, 1995. – P. 154–158.

16. Trias R., Baneras L., Montesinos E., Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi // International Microbiology. – 2008. – Vol. 11. – P. 231–236.



References

1. Vasyliuk OM, Kovalenko NK, Garmasheva IL. Antagonistichni vlastyvoli shtamiv *Lactobacillus plantarum* isoliiovanykh z tradyziinikh fermentovanih produktiv Ukrainy. Journal of Microbiology. 2014. 76: 24 – 30 (in Ukrainian).
2. DSTU 4138-2002 Nasinnia silskogospodarskikh kultur. Metody vyznachennia iakosti. 2003. Kyiv: Derzhpozhyvstanart Ukraini: 170 (in Ukrainian).
3. Merlich AG, Limanska NV, Zhunko ID, Babenko DO. Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus atrophaeus* on germination of wheat seeds and seedlings growth. Microbiology and Biotechnology. 2017. 1: 36 – 47 (in Ukrainian).
4. Rzhevskaia VS, Oturina IP, Teplitskaia LM. Izuchenie biologicheskikh svoistv shtammov molochnokisllykh bakterii. Uchenye zapiski Tavricheskoho natsyonalnoho universiteta im. V.I. Vernadskoho, Seriya "Biolohiia, khimiia". 2014. 27: 145 – 160 (in Ukrainian).
5. Corsetti A, Gobbetti M, Rossi J, Damiani P. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco*. Appl Microbiol Biotechnol. 1998. 50: 253– 256.
6. De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. J Appl Bacteriol. 1960. 23:130-135.
7. Goffin P, de Bunt B, Giovane M, Leveaue JHJ, Hoppener-Ogawa S, Teusink B, Hugenholtz J. Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth. Molecular Systems Biology. 2010. 6:431. doi: 10.1038/msb.2010.67.
8. Higa T, Kinjo S. Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation. In: Proceedings of 1th Int. Conf. On Kyusei Nature Farming, KhonKaen, Thailand, 1989: 13-16.
9. Hoda AH, Yomna AM, Shadia MA-A. *In vivo* efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant. Life Science J. 2011. 8: 462–468.
10. Limanska N, Ivanytsia T, Basiul O, Krylova K, Biscola V, Chobert JM, Haertlé T. Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings. Acta physiologiae plantarum. 2013. 35:1587 – 1595.
11. Lutz MP, Michel V, Martinez C, Camps C. Lactic acid bacteria as biocontrol agents of soil-born pathogens. Biological control of fungal and bacterial plant pathogens. IOBC-WPRS Bulletin. 2012. 78: 285-288.
12. Mackowiak CL, Owens LP, Hinkle CR. Continuous hydroponic wheat production using a recirculating system. NASA Technical Memorandum. NASA Biomedical operations and research office, Kennedy Space Center, Florida, USA, 1989: 60 p.
13. Narasimha M, Malini M, Savitha J, Srinivas C. Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. Pest Management in Horticultural Ecosystems. 2012. 18:60–65.
14. Page V, Feller U. Selection and hydroponic growth of bread wheat cultivars for bioregenerative life support systems. Advances in space research. 2013. 52: 586 – 546.



15. Primavesi AM. Effect of *Lactobacillus* inoculants, organic amendments and mineral elements on yield of onion and field bean. Proc. of 4th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Paris, France. 1995: 154 – 158.

16. Trias R, Baneras L, Montesinos E, Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. International Microbiology. 2008. 11: 231-236.

Стаття надійшла до редакції 26.07.2018 р.



T. V. Ivanytsia, I. V. Strashnova

Odesa National I. I. Mechnykov University,
2, Dvoryanska str, Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: t.ivanytsia@gmail.com

**QUANTITY AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE
BACTERIUM *PANTOEA AGGLOMERANS* ISOLATED
FROM DIFERENT GRAPE VARIETIES
IN ODESA REGION**

Aim. To isolate and investigate the biological properties of *Pantoea agglomerans* from the internal environment of grapes and tumors selected from the vineyards of the Odessa region. **Methods.** Samples of the grapevines of Arkadia, Moldova and Odessa souvenirs varieties and tumors cut from the affected veins and were pre-sterilized, chopped into fragments, filled into a distilled water flask and stirred in a shaker at 28 °C for 3 hours. It was made 10-times dilutions and cultured on the surface of Petrie`s dishes with nutritients agar. Incubation on 28 °C, 24–48 hours. Conducted quantitative calculations, isolated pure cultures and examined their cultural, morphological, physiological and biochemical properties, determined the composition of cell lipids, and identified isolated strains. Antagonistic activity of *P. agglomerans* was determined by well-diffusion method. **Results.** Quantities of bacteria in inner part of grape fluctuated approximately $5,63 \pm 1,3 \times 10^3$ CGU / cm^3 – $2,96 \pm 1,3 \times 10^3$ CGU / cm^3 and depended from time of the year and variety of grape. Quantities of microorganisms in tumors was bigger than in non damaged vine in the same period. Weight percentage *P. agglomerans* in vine fluctuated from 5.7% till 68.2%, in tumors – from 9.88% till 23.08%. Strains of *P. agglomerans* isolated from endophytic medium of grape and tumor, characterized of similar morphological features. There were observed the ability to utilize carbohydrates, but in minor. *Pantoea* strains did not consume sucrose from the tumors and 25.0% utilized raffinose in aerobic conditions, unlike strains from the intact vine. The fatty acid spectrum was represented by fatty acids containing 12 to 19 carbon atoms in the chain. Eighteen strains have been identified as *P. agglomerans*-GC subgroup A by fatty acid composition. For the strains examined, the dominant profiles are C16: 0, C12: 0, C14: 0, C17: 0 cyclo w7c. The isolated strains of *P. agglomerans* did not show antagonistic activity to the collection strains of *E. carotovora*, *A. tumefaciens* and *A. vitis*. **Conclusions.** The quantitative composition of the microbiota endophytic medium of the vine and the tumors was different and depended on the source of isolation, weather conditions and grape variety. The strains of *P. agglomerans* isolated from the vine and tumors were characterized by the same biological characteristics, with the exception of the ability to dispose of individual carbohydrates. Fatty acid composition of the investigated strains of *Pantoea* was represented by fatty acids with 12 to 19 carbon atoms in the chain. Antagonistic activity in the collection strains of *E. carotovora*, *A. tumefaciens* and *A. vitis* was not detected.



Key words: *Pantoea agglomerans*, endophytic medium of grapevine and tumors, number, biological properties.

Pantoea agglomerans (Beijerinck 1888) comb. Nov [12] Earlier *Enterobacteragglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife (1972), *Erwinia herbicola* (Löhnis 1911) Dye 1964, or *Erwinia milletiae* (Kawakami and Yoshida 1920) Magrou 1937, are gram-negative bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family.

P. agglomerans, mainly, an epiphytic plant pathogen that develops on the surface of plants, or an endophyte that resides within plants [3, 19].

The widespread distribution of these bacteria in nature (they also occur in plant and animal products, in the body of animals, in water, soil, dust and air, and sometimes in humans) and their biological role in the different objects of existence are the subject of discussion and ambiguous relation to them. On the one hand, they can cause disorders in humans [18], can cause diseases of crops [8, 9], and on the other hand, they produce substances that are effective in the treatment of cancer and other diseases of humans and animals, inhibit the development of various plant pathogens, promote the growth of plants and is a potentially effective biological fertilizer and biomediator [7, 10].

Since *P. agglomerans* characterizes the versatility of biology, ecology, and the role of the environment, scientific interest in them does not subsist. In view of this, the purpose of the work was to isolate and investigate the biological properties of *Pantoea agglomerans* from the endophytic medium of grapes and tumors selected from the vineyards of the Odessa region.

Materials and methods

In this work samples (stems) from the grapes "Arcadia", "Moldova" and "Odessa souvenir" were used, as well as tumors, and cut from the affected vine grapes of these varieties.

The preparation of all samples was unified and consisted of the following stages. Samples of the grapevine and the tumors were preliminarily soaked under running water, washed with sterile distilled water, and sterilized the surface, treating 96 °C with alcohol and flaming.

After this, maintaining sterile conditions, the selected samples were chopped into fragments approximately 0.5 cm in size, 10 g of which were transferred to conical flasks of 250 cm³ and placed on 50 cm³ of sterile distilled water for each sample. Experimental samples were mixed in a shaker (from New Brunswick at 250 RPM) at 28 °C for 3 h. After that, a series of 10 consecutive dilutions was made. Petri dishes with nutrient agar (Merck, Germany) were cultured on the surface of 0.1 cm³ of appropriate dilutions. The seeds were incubated at 28 °C for 24–48 hours.

It was calculated a quantitative of microorganisms that grew up, isolated pure cultures and investigated biological properties: cultural, morphological, physiological and biochemical.

For the analysis of cell lipids composition, samples were prepared with bacterial cultures which were pre-incubated at Tryptic soy agar (Merck, Germany) at a temperature of 28 ± 1 °C for 24 hours.



Three full loops of biomass were placed in the reaction vial and a concentrated NaOH solution was added. This samples was thoroughly mixed and placed on a water bath and maintained at 95–100 °C for 5 minutes. After that, the mixing was repeated and left in a water bath at 95–100 °C for 25 minutes to completely destroy the bacterial cells and purify the lipids. To the cooled suspension, a solution of acidified methanol was added and held in a water bath at 80 °C for 10 minutes to obtain the fatty acid methyl esters, which were then extracted with hexane. The extract was neutralized with 0.3 M alkaline solution and analyzed by gas chromatography [1].

The chromatographic separation of methyl esters of LC was performed on a gas chromatograph Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA) with a capillary column ULTRA 2 and a semi-ionization detector. Samples of 2 µl were injected into the evaporator in a split mode with a coefficient of 40:1, temperature of evaporator 250 °C. The separation was carried out in the programming mode of temperature – the initial temperature 170 °C with a gradient of 5 °C / min to 270 °C. The fatty acids content was expressed as a percentage of the total sum of peak areas.

MIDI Sherlock 4.5 software and the RSTBA6 version 6.21 fatty acid profile of the aerobic microorganisms were used to identify the strains examined for their fatty acid profile.

The antagonistic activity of the strains of *P. agglomerans* to the collection strains of *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium vitis*, as well as intrinsic antagonism were determined by the hole diffusion method, measuring the growth test inhibition zones of the test strains after 24 hours of cultivation at 28 °C [2].

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 and discussion

The internal environment of the vine grape contains a significant number of bacteria that influence on the lasting of physiological processes in plants, promote the protection of plants against pathogens, but some, under certain conditions, can cause disease or influence on the infectious process. These bacteria include *P. agglomerans*, which can be used as an indicator of yeast and mold (mold) fungal biocontrol, pathogenic bacteria, but it can itself be an opportunistic pathogen.

Experimental studies were carried out in April-October 2017. Depending on the month of the research and the grape variety, the number of microorganisms of the internal environment of the grapes varied within the limits of $5.63 \pm 1.3 \text{ ms}10^3 \text{ CFU} / \text{cm}^3 - 2.96 \pm 1.3 \text{ ms}10^5 \text{ CFU} / \text{cm}^3$.

The smallest number of microbiota was detected in April, the largest in September 2017, due to weather seasonal and climatic conditions.

In September and October, defects in the form of tumors were detected on grape barrels of all varieties, in the internal environment the total number of microbiota was higher in September (Fig. 1).

The obtained results indicate the sensitivity of these bacteria to weather conditions. The frequency of isolation of *P. agglomerans* was bigger in September



2017 (for sufficiently dry weather and moderate summer temperature, 28–30 °C), the smallest – in October of this year (when in the beginning of the month there was a significant decrease in temperature, 12–15 °C).

In addition to *P. agglomerans*, other microorganisms were isolated from the endophytic medium of grapes, most of which were representatives of the genera *Agrobacterium* and *Erwinia*.

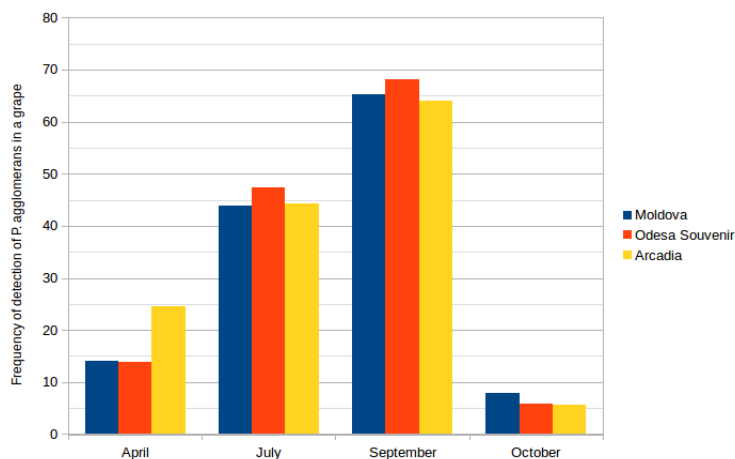


Fig. 1. Frequency of detection of bacteria *P. agglomerans* in a grape, 2017 year (data presented in percentages)

P. agglomerans were also isolated from the internal environment of the tumors. The percentage of them among the other microbiota was higher in October and amounted to slightly more than 20.0%, in September this figure was two times smaller (Figure 2).

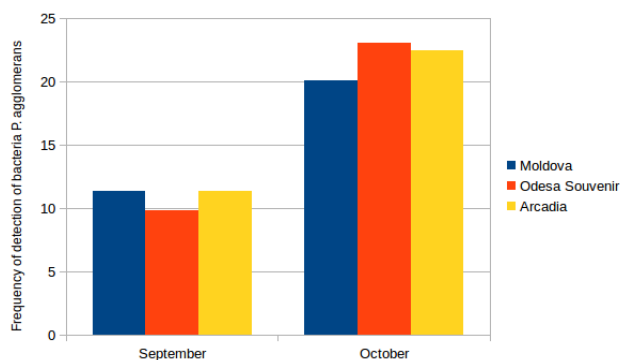


Fig. 2. Frequency of detection of bacteria *P. agglomerans* in a grape's tumor in 2017 year

Comparing the obtained data shown in Fig. 1 and 2, it should be noted that in September in the endophytic environment of the intact grapevine all varieties were dominated by *P. agglomerans*, whereas in tumors their proportion was much

smaller. In October, in the grapevine, the proportion of *P. agglomerans* decreased significantly, while in tumors, on the contrary, it increased. The taxonomic composition of the bacteria isolated from the tumors was more varied than in the grapevine. Among the isolates, bacteria of the genus *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Achromobacter*, *Serratia* predominated.

Compare obtained results and data with literary sources [10, 18], it was supposed that bacteria *P. agglomerans* could be as representative in both sides, of normal microbiota of grapes and one of the potential pathogens involved in the formation of tumors.

Biological properties have shown that isolated and selected samples were coinciding with the characteristics of bacteria *P. agglomerans*. All strains of *P. agglomerans* were able to grow on nutrient agar; forming in 24 hours at 28 °C rounded, smooth, regular, carved, shiny, translucent colonies; capable for pigmentation of bright yellow color; with sizes of 0.5–3 mm.

A microscopic study has shown that isolated bacteria are gram-negative, the rod-shaped, with rounded ends. The cell sizes are defined within the range of 0.5 – 1.0 × 1 – 3 μm. Bacteria are capable to movement. Also, the optimal growth temperature was observed in the range of 25–30 °C, and it is typical for these bacteria.

All strains are oxidase-negative and catalase-positive. The ability to utilize carbohydrates was different in strains isolated from intact grapevine and from tumors (Table 1).

All tested strains were utilized only with the release of maltose, mannose, mannitol, xylose, rhamnose in aerobic and anaerobic conditions, and lactose only in anaerobic conditions. *Pantoea* strains isolated from tumors did not consume sucrose and 25.0% utilized raffinose in aerobic conditions, unlike strains from intact grapevines.

For the *Pantoea agglomerans* strains the presence of isomers of fatty acids with a carbon chain length of 12 to 19 carbon atoms were shown. Among the saturated isomers, hexadecanoic acid (C16:0) was dominant with a total content of 29.1 to 30.83% of the total sum of peak areas. The content of tetradecanoic acid (C14:0) ranged from 4.78 to 5.72%, dodecan (C12:0) – from 3.04 to 4.57%, octadecanoic acid – from 0.24 to 0.37%. The content of saturated isomers with an odd number of carbon atoms: tridecan (C13:0), heptadecan (C17:0) was within the range of no more than 0.14 and 0.34%, respectively. For all studied strains, a high content of cycloheptadecanoic acid (cyclo-C17:0) was characterized from 3.74 to 7.55% of the total sum of peak areas. For strains 1a and 4, the presence of pentadecanoic fatty acid (C15:0) in the amount less than 0.1% is shown. For these strains, the presence of both 13-methyl-pentadecane (iso) and 12-methyl-pentadecane (anteiso) isomers was characterized. The presence of cyclo-nonadecanoic acid (cyclo-C19:0) in trace amounts for most strains has been shown.

For the fatty acid composition of all investigated strains of *Pantoea agglomerans*, the dominance of a mixture of isomers of hexadecenic acid (C16:1) was characteristic, the content of which ranged from 30.33 to 36.92%. The presence of isomers with unsaturated bonds in the 9, 10, and 11 positions of the carbon chain is shown. Dominant were 9-hexadecenic (9-C16:1) and 10-hexadecenic



Table 1

Biochemical activity of *Pantoea* strains isolated from grape and tumors

Carbons		Strains, isolated from	
		Vinegrape	Tumors
Maltose	Aerobic conditions	+	+
	Anaerobic conditions	+	+
Mannose	Aerobic conditions	+	+
	Anaerobic conditions	+	+
Mannitol	Aerobic conditions	+	+
	Anaerobic conditions	+	+
Xylose	Aerobic conditions	+	+
	Anaerobic conditions	+	+
Rhamnose	Aerobic conditions	+	+
	Anaerobic conditions	+	+
Glucose	Aerobic conditions	+	+
	Anaerobic conditions	+	+
Lactose	Aerobic conditions	-	-
	Anaerobic conditions	+	+
Sucrose	Aerobic conditions	+	-
	Anaerobic conditions	+	+
Raffinose	Aerobic conditions	-	[-]
	Anaerobic conditions	+	+

Note: "+" – positive characteristic; «-» – negative characteristic; "[-]" – positive characteristic in 25.0% strain.

(10-C16:1) isomers. Among the unsaturated isomers for all investigated strains, 11-octadecenoic fatty acid (11-C18:1) was characterized by a content of 10.43 to 14.0%. 13-Oktadecenic acid was detected in trace amounts in strains 1a, 3, 9, 15, 22x, 24, 25, 27.

For all investigated strains, the presence of hydroxylated fatty acids was characterized. Thus, the content of 3-hydroxy-tetradecanoic acid (3-OH-C14: 0) ranged from 6.22 to 9.98% of the total sum of peak areas. The content of 2-hydroxy-dodecanoic acid was observed at a level less than 0.1% for strains 1a, 4, 15, 22x, 24, 25 and 27. For strains 35, 36, 41 and 41a, the presence of a small amount of 3-hydroxy-pentadecane acids (3-OH-C15:0) – less than 0,2% was shown.

For strains 35, 36, 41 and 41a, a small amount of 3-hydroxy-pentadecanoic acid (3-OH-C15:0) is shown to be less than 0.2%. For strains 35 and 41a, the presence of 2-hydroxy-pentadecanoic acid (2-OH-C15:0) in the amount of 0.33 and 0.4%, (Table 2), respectively, is shown.

The genus *Pantoea* was first described by Gavini [12] with the sole representatives of the species *Pantoea agglomerans*. To date, this genus has 22 validated and described species, among which *Pantoea allii*, *Pantoea brenneri*,



Pantoea calida, *Pantoea coffeiphila*, *Pantoea conspicua*, *Pantoea intestinalis*, *Pantoea rodasii*, *Pantoea rwandensis*, *Pantoea theicola*, *Pantoea alhagi*, recently posted.

Representatives of the genus *Pantoea* belong to the *Enterobacteriaceae* family. One of the chemotaxonomic markers of this group is the presence of hydroxy acids in the structure of the lipopolysaccharides. The lipopolysaccharides are the main component of the external membrane of the cellular wall of gram-negative bacteria, which plays a key role in interaction of the cell with surrounding objects. Thus, in the purified lipopolysaccharides of the strain *Pantoea agglomerans* 7969 3-hydroxytridecanoic acid, dodecanoic, tetradecanoic, hexadecanoic and 2-hydroxytetradecanoic were detected.

The total fatty acid composition of the typical *Pantoea agglomerans* LMG 1286T cells includes typical dodecanoic, tetradecanoic, hexadecanoic, cycloheptadecanoic fatty acids in the amount of 3.8; 6; 27.1; 13.2% of the total sum of peak areas [16]. A characteristic feature is the high content of hexadecanoic and octadecanoic fatty acids – 24.2 and 11.6%, respectively. The content of 3-hydroxytridecanoic acid is 6%. Brady et al. characterized three new species of the *Pantoea* family that cause bacterial blight and dieback of eucalyptus in Colombia – *Pantoea rodasii*, Rwanda – *Pantoea rwandensis* and South Africa – *Pantoea wallisii* [5,4,6]. All isolates were characterized by a typical set of fatty acids of representatives of *Pantoea*. Strains *Pantoea rodasii*, *Pantoea rwandensis* had a close spectrum (Table 2). *Pantoea wallisii* differs from the two previous slightly higher content of octadecanoic fatty acid – 18.8%, and decrease in the proportion of hexadecanoic 16.3% and tetradecanoic acid 3.5%.

Fatty acid composition of the representatives of the genus *Pantoea* has a typical set of fatty acids. It is characterized by high content of unsaturated isomers - hexa- and octadecanoic acids, saturated dodecanoic, tetradecanoic, hexadecanoic, cycloheptadecanoic fatty acids. The presence of hydroxylated isomers at least 3-hydroxydodecanoic is compulsory.

In the investigated isolates, the presence of all characteristic isomers with contents close to those described in the literature of isolates is shown (Table 3).

High similarity indices obtained when identifying investigated isolates using the automated identification system of MIDI Sherlock microorganisms allow us to conclude that they belong to the *Pantoea* family.

Also considering that the cause of some infectious diseases of the grapes is the bacteria of the genera *Erwinia* and *Agrobacterium*, and it was they who dominated in the internal environment of the vines and tumors, the ability of the isolated *P. agglomerans* strains to suppress the growth of the collection strains of *E. carotovora* (12 strains), *A. tumefaciens* (2 strains) and *A. vitis* (1 strain) was investigated. It was found that none of the investigated collection strains of phytopathogenic bacteria shown sensitivity to the metabolites of strains *P. agglomerans*.

Thus, studies have shown that the quantitative composition of the endophytic microbiota of the intact vine and tumors varied depending on the weather conditions and the grape variety, while in the tumors the number of bacteria was higher. The frequency isolation bacteria of the genus *Pantoea* was determined by the medium of selection and weather conditions and did not depend on the grape variety. The



Table 2

Fatty acid composition isolated strains from a grape and a tumors

Peak Name	1	1a	3	4	5	7	9	10	12	15	22x	24	25	27	35	36	41	41a
12:00	3.72	3.06	3.62	3.3	3.83	3.54	3.61	3.44	3.25	3.84	3.19	3.04	3.33	3.31	3.96	3.98	4.57	4.12
13:00	0.06	0.05	0.1	0.08	0.07	----	0.05	----	----	0.07	0.05	0.05	0.07	0.06	----	----	0.14	----
12:0 3OH	----	0.04	----	0.05	----	----	----	----	----	0.04	0.03	0.05	0.04	0.04	----	----	----	----
14:00	5.51	4.79	4.8	5.13	4.94	4.98	5.31	5.23	5.15	5.03	5.04	4.78	5.27	5.11	5.51	5.6	5.72	5.42
15:0 iso	----	0.07	----	0.1	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
15:0 anteiso	----	0.06	----	0.11	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0.12	0.12	----
14:0 3OH	6.81	7.15	6.76	6.43	6.13	8.14	6.22	6.34	6.28	6.51	7.12	7.15	7.51	7.54	9.3	8.46	9.98	9.74
16:1 w7c/16:1 w6c	35.68	34.5	33.09	36.24	35.34	36.1	36.24	36.1	36.92	34.88	34.47	36.01	35.61	34.68	31.73	30.33	30.8	30.65
16:1 w5c	0.14	0.12	0.13	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.12	0.12	0.14	0.15	0.13	0.1	0.11	0.11	0.18
16:00	29.53	30.43	29.1	29.36	29.73	28.41	29.79	30.66	29.65	29.97	31.21	29.86	29.43	30.46	29.87	30.83	28.25	29.2
15:0 iso 3OH	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1.02	1.96	1.52	1.41
15:0 2OH	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0.33	----	----	0.4
17:0 anteiso	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0.19
17:1 w8c	----	0.05	0.07	0.05	----	----	----	----	----	0.05	0.04	0.05	0.06	0.05	----	----	----	0.33
17:0 cyclo	5.25	4.8	5.88	4.54	4.3	4.57	5.32	4.67	4.42	4.6	4.89	3.74	5.33	5.17	5.97	7.11	7.55	5.64
17:00	0.19	0.24	0.48	0.31	0.33	0.26	0.21	0.17	0.18	0.3	0.2	0.26	0.27	0.25	0.26	0.34	0.4	0.43
18:0 ante/18:2 w6,9c	----	0.06	0.06	----	----	----	----	----	----	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05	----	----	----	0.11

Table continued

18:1 w7c	12.35	13.63	14.95	13.37	14.41	13.03	12.25	12.21	13.09	13.58	12.62	14	11.91	12.16	11.59	10.64	10.43	10.83
18:1 w5c	----	0.05	0.05	----	----	----	0.05	----	----	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	----	----	----	----
18:00	0.21	0.3	0.29	0.25	0.29	0.3	0.24	0.24	0.21	0.23	0.25	0.24	0.21	0.24	0.26	0.37	0.24	0.34
19:0 cyclo w8c	0.09	0.1	0.15	0.1	0.1	----	0.09	0.07	0.1	0.09	0.08	0.08	0.1	0.08	0.1	0.13	0.17	0.12
Similarity Index	0.869	0.769	0.944	0.763	0.815	0.708	0.759	0.723	0.701	0.847	0.823	0.731	0.767	0.822	0.862	0.789	0.707	0.74

Table 3

The total-cellular fatty acid composition of representatives of the genus *Pantoea*

Peak Name	<i>P. agglomerance</i> LMG 1286	<i>P. calida</i> LMG 25383	<i>P. gaviviae</i> LMG 25382	<i>P. rodasii</i>	<i>P. rwandensis</i>	<i>P. wallisi</i>	Content in observing strains
12:00	3.8	5.4	5.3	4.5	4.2	5.8	3.04-4.57
14:00	6	6.6	6.7	6.7	6.9	3.5	4.78-5.72
15:0iso	1.1	----	----	----	----	----	<0.1
14:0 3OH	11.2	6.9	7.1	13.9	14.3	15.3	6.22-9.98
16:1 w7c/16:1w6c	24.2	23.9	27.2	23.8	26.5	16.3	30.33-36.92
16:1w5c	----	----	----	----	----	----	0.1-0.18
16:00	27.1	31.8	32.1	27.4	26.1	25.6	29.1-30.38
17:0 cyclo	13.2	1.3	----	8.8	7.1	7.9	3.74-7.55
17:00	<1	<0.5	----	----	----	----	0.17-0.34



biological properties of the *P. agglomerans* strains isolated from the veins and tumors were the same except of the ability to utilize individual carbohydrates. Allocated strains are not capable to suppress the growth of collection strains of phytopathogenic bacteria.

Т. В. Іваниця, І. В. Страшнова

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: t.ivanytsia@gmail.com

ЧИСЕЛЬНІСТЬ І БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ *PANTOEA AGGLOMERANS*, ВИДІЛЕНИХ З РІЗНИХ СОРТІВ ВИНОГРАДУ ОДЕСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Реферат

Мета. Ізолювати і дослідити біологічні властивості *Pantoea agglomerans* із внутрішнього середовища виноградної лози і пухлин виноградної лози, відібраних з виноградників Одеської області. **Методи.** Зразки виноградної лози сортів «Аркадія», «Молдова» і «Одеський сувенір» і пухлин, зрізаних з ураженої лози цих сортів, попередньо стерилізували фламбуванням, подрібнювали на фрагменти, вносили їх у колби з дистильованою водою і перемішували в шейк ері при 28 °С протягом 3 год. Робили серію 10-ти кратних послідовних розведень і висівали на поверхню чашок Петрі з поживним агаром. Інкубували при 28 °С протягом 24–48 год. Проводили кількісний облік, виділяли чисті культури і досліджували їх культуральні, морфологічні, фізіолого-біохімічні властивості, визначали склад клітинних ліпідів та проводили ідентифікацію виділених штамів. Антагоністичну активність *P. agglomerans* визначали лунково-дифузійним методом. **Результати.** Чисельність бактерій у внутрішньому середовищі винограду коливалася у межах $5,63 \pm 1,3 \times 10^3$ КУО/см³ – $2,96 \pm 1,3 \times 10^5$ КУО/см³ і залежала від пори року і сорту винограду. Кількість мікроорганізмів у пухлинах була більшою ніж в неушкодженій лозі у той же період. Масова частка *P. agglomerans* у лозі коливалася від 5,7% до 68,2%, у пухлинах – від 9,88% до 23,08%. Штами *P. agglomerans*, виділені із ендofітного середовища винограду і пухлин, характеризувалися однаковими морфологічними, культуральними, тінкторіальними, фізіологічними властивостями. Незначні відмінності спостерігалися у здатності до утилізації вуглеводів. Штами *Pantoea* із пухлин не споживали цукрозу і 25,0 % утилізували раффінозу в аеробних умовах, на відміну від штамів із неушкодженої лози. Жирнокислотний спектр був представлений жирними кислотами, що містять у ланцюзі від 12 до 19 атомів вуглецю. За жирнокислотним складом вісімнадцять штамів були ідентифіковані як *P. agglomerans*-GC subgroup A. Для досліджуваних штамів домінантними в профілі є C16:0, C12:0, C14:0, C17:0 cyclo^w7c. Виділені штами *P. agglomerans* не проявили антагоністичної активності щодо колекційних штамів *E. carotovora*, *A. tumefaciens* і *A. vitis*. **Висновки.** Кількісний склад мікробіоти ендofітного середовища лози і пухлин був неоднаковим і залежав від джерела виділення, погодних умов і сорту винограду. Штами *P. agglomerans*, виділені із лози і пухлин, характеризувалися однаковими біологічними ознаками, за виключенням здатності до утилізації окремих



вуглеводів. Жирнокислотний склад досліджених штамів *Pantoea* був представлений жирними кислотами з 12–19 атомів вуглецю у ланцюзі. Антагоністичної активності до колекційних штамів *E. carotovora*, *A. tumefaciens* і *A. vitis* не виявлено.

Ключові слова: *Pantoea agglomerans*, ендofітне середовище виноградної лози і пухлин, чисельність, біологічні властивості.

Т. В. Іваниця, І. В. Страшнова

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: t.ivanytsia@gmail.com

ЧИСЛЕННОСТЬ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ *PANTOEA AGGLOMERANS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА ОДЕССКОЙ ОБЛАСТИ

Реферат

Цель. Изолировать и исследовать биологические свойства *Pantoea agglomerans* из внутренней среды винограда и опухолей, отобранных из виноградников Одесской области. **Методы.** Образцы виноградної лози сортів «Аркадія», «Молдова» і «Одесский сувенир» і опухолей, срезанных с пораженной лозы этих сортов, предварительно стерилизовали, измельчали на фрагменты, вносили в колбы с дистиллированной водой и перемешивали в шейкере при 28 °С в течение 3 ч. Делали серию 10-ти кратных последовательных разведений и высевали на поверхность чашек Петри с питательной агаром. Инкубировали при 28 °С в течение 24–48 часов. Проводили количественный учет, выделяли чистые культуры и исследовали их культуральные, морфологические, физиолого-биохимические свойства, определяли состав клеточных липидов и проводили идентификацию выделенных штаммов. Антагонистическую активность *P. agglomerans* определяли дуночно-диффузным методом. **Результаты.** Численность бактерий во внутренней среде винограда колебалась в пределах $5,63 \pm 1,3 \times 10^3$ КОЕ/см³ — $2,96 \pm 1,3 \times 10^3$ КОЕ/см³ и зависела от времени года и сорта винограда. Количество микроорганизмов в опухолях была больше чем в неповрежденной лозе в тот же период. Массовая доля *P. agglomerans* в лозе колебалась от 5,7% до 68,2%, в опухолях – от 9,88% до 23,08%. Штаммы *P. agglomerans*, выделенные из эндofітної среды винограда и опухолей, характеризовались одинаковыми морфологическими, культуральными, тинкториальными, физиологическими свойствами. Незначительные различия наблюдались в способности к утилизации углеводов. Штаммы *Pantoea* из опухолей не разлагали сахарозу и 25,0 % утилизировали раффинозу в аэробных условиях, в отличие от штаммов с неповрежденной лозы. Жирнокислотный спектр был представлен жирными кислотами, содержащими в цепи от 12 до 19 атомов углерода. По жирнокислотному составу восемнадцать штаммов были идентифицированы как *P. agglomerans*-GC subgroup A. Для исследуемых штаммов доминантными в профиле являются C16:0, C12:0, C14:0, C17:0 cyclo w7c. Выделенные штаммы *P. agglomerans* не проявили антагонистической активности в



отношении коллекционных штаммов *E. carotovora*, *A. tumefaciens* и *A. vitis*.

Выводы. Количественный состав микробиоты эндофитной среды лозы и опухолей был неодинаковым и зависел от источника выделения, погодных условий и сорта винограда. Штаммы *P. agglomerans*, выделенные из лозы и опухолей, характеризовались одинаковыми биологическими признаками, за исключением способности к утилизации отдельных углеводов. Жирнокислотный состав исследованных штаммов *Pantoea* был представлен жирными кислотами с 12–19 атомами углерода в цепи. Антагонистической активности к коллекционным штаммам *E. carotovora*, *A. tumefaciens* и *A. vitis* не обнаружено.

Ключевые слова: *Pantoea agglomerans*, эндофитная среда виноградной лозы и опухолей, численность, биологические свойства.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Іваниця В. О., Горшкова О. Г., Коротаєва Н. В., Волювач О. В., Гудзенко Т. В., Остапчук А. М. Склад жирних кислот ліпідів штаму *Bacillus* sp. ОЗ-5, виділеного із забрудненого нафтою ґрунту о. Зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – 32, № 4. – С. 28–36.
2. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М., Колотилова Н. Н. и др. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
3. Andrews J. H., Harris R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. // Ann. Rev. Phytopathol. – 2000. – 38. – P. 145–180.
4. Brady C. L. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. Nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium cypripedii* (Hori 1911) Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 to the genus as *Pantoea cypripedii* comb. nov. Int. // J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. – 60. – P. 2430–2440.
5. Brady C. L., Cleenwerck I., Westhuizen L. V., Venter S. N., Coutinho T.A., & Vos P.D. *Pantoea rodasii* sp. nov., *Pantoea rwandensis* sp. nov. and *Pantoea wallisii* sp. nov., isolated from Eucalyptus. // International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology. – 2016. – 62. – P. 1457–1464.
6. Brady C.L. et al. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA) // Syst. Appl. Microbiol. – 2008. – 31. – P. 447–460.
7. Costa E., Teixidó N., Usall J., Atarés E., Viñas I. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA -2 using commercial products and by-products. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. 56 – P. 367–371.
8. Cruz A.T., Cazacu A.C., Allen C.H. *Pantoea agglomerans*: a plant pathogen causing human disease. // J. Clin. Microbiol. – 2007. – 45:6. – P. 1989–1992.
9. Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Kinga Lemieszek M., Golec M., Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good: Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. Ann. Agric. Environ. Med. // 2016. – 23:2. – P. 197–205.
10. Dutkiewicz J, Mackiewicz B, Kinga Lemieszek M, Golec M, Milanowski J.



Pantoea agglomerans: a mysterious bacterium of evil and good: Part IV. Beneficial effects. // Ann. Agric. Environ. Med. –2016.- 23 :2.–P. 206–222.

11. Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Kinga Lemieszek M., Golec M. & Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. // Ann. Agric. Environ. Med. – 2016. – 23. – P. 197–205 .

12. Gavini F, Mergaert J., Beji A., Mielcarek C., Izard D., Kersters K., De Ley J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. Int. // J. Syst. Bacteriol. 1989. – 39:3. – P. 337–345.

13. Kato Tanaka Y. et al. *Pantoea theicola* sp. nov., isolated from black tea. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2015. – 65. – P. 3313–3319.

14. Lim J.A., Lee D.H., Kim B.Y. & Heu S. Draft genome sequence of *Pantoea agglomerans* R190, a producer of antibiotics against phytopathogens and foodborne pathogens. // J. Biotechnol. – 2014. – 188. – P. 7–8.

15. Mishra A., Chauhan P. S., Chaudhry V., Tripathi M. & Nautiyal C. S. Rhizosphere competent *Pantoea agglomerans* enhances maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, without altering the rhizosphere functional diversity. Anton. Leeuw. // Int. J. G.2011. – 100. – P. 405–413.

16. J. Mergaert, L. V. UGent, K. Kersters Transfer of *Erwinia-ananas* (synonym, *Erwinia-uredovora*) and *Erwinia-stewartii* to the genus *Pantoea* emend as *Pantoea-ananas* (serrano 1928) comb-nov and *Pantoea-stewartii* (smith 1898) comb-nov, respectively, and description of *Pantoea-stewartii* subsp indologenes subsp nov. // Int. J. Syst. Bacteriol.1993. – 43. –P. 162–173.

17. Popp A., Cleenwerck I., Iversen C., De Vos P. & Stephan R. *Pantoea gaviniae* sp. nov. and *Pantoea calida* sp. nov., isolated from infant formula and an infant formula production environment. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol.2010. – 60. – P. 2786–2792.

18. Rezzonico F., Smits T.H.M., Montesinos E., Frey J.E., Duffy B. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. // BMC Microbiology. – 2009. – 9. –P. 204.

19. Sturz A.V., Christie B.R., Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. // Critical Reviews in Plant Science. 2000. – 19. – P. 1–30.

References

1. Ivanytsia VO, Gorshkova OG, Korotaieva NV, Voluvach OV, Gudzenko TV, Ostapchuk AM. The composition of fatty acids of strain *Bacillus* sp. OZ-5, isolated from oil contaminated ground from Zmiiniy island. // Mikrobiologiya i biotechnologiya. 2015; 32(4): 28–36. (in Ukrainian)

2. Netrusov AI, Egorova MA, Zaharchuk LM, Kolotilova NN Microbiology of work shop: Textbook for higher education institutions. // Moscow: Akademiya, 2005. 608.(in Russian)

3. Andrews JH, Harris RF. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. Ann. Rev. Phytopathol. 2000; 38:145–180.

4. Brady C L. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four



species from human clinical samples, *Pantoeaseptica* sp. nov., *Pantoeaeucrina* sp. nov., *Pantoeabrenneri* sp. nov. and *Pantoeaconspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacteriumcypripedii* (Hori 1911) Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 to the genus as *Pantoeacyclopodii* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010; 60: 2430–2440.

5. Brady CL, Cleenwerck I, Westhuizen, LV, Venter, SN, Coutinho TA, Vos P D. *Pantoea rodasii* sp. nov., *Pantoea rwandensis* sp. nov. and *Pantoea wallisii* sp. nov., isolated from Eucalyptus. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology. 2016; 62:1457–1464.

6. Brady CL. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). Syst. Appl. Microbiol. 2008; 31: 447–460.

7. Costa E, Teixidó N, Usall J, Atarés E, Viñas I. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA -2 using commercial products and by-products. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001; 56: 367–371.

8. Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH. *Pantoea agglomerans*: a plant pathogen causing human disease. J. Clin. Microbiol. 2007;45(6): 1989–1992.

9. Dutkiewicz J, Mackiewicz B, Kinga Lemieszek M, Golec M, Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good: Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. Ann. Agric. Environ. Med. 2016; 23 (2): 197–205.

10. Dutkiewicz J, Mackiewicz B, Kinga Lemieszek M, Golec M, Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good: Part IV. Beneficial effects. Ann. Agric. Environ. Med. 2016; 23 (2): 206–222.

11. Dutkiewicz J, Mackiewicz B, Kinga Lemieszek M, Golec M, Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. Ann. Agric. Environ. Med. 2016; 23: 197–205 .

12. Gavini F, Mergaert J, Beji A, Mielcarek C, Izard D, Kersters K, De Ley J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1989; 39 (3): 337–345.

13. Kato Tanaka, Y. *Pantoea theicola* sp. nov., isolated from black tea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015; 65: 3313–3319.

14. Lim, JA, Lee DH, Kim BY, Heu S. Draft genome sequence of *Pantoea agglomerans* R190, a producer of antibiotics against phytopathogens and foodborne pathogens. J. Biotechnol. 2014; 188: 7–8.

15. Mishra A, Chauhan PS, Chaudhry V, Tripathi M, Nautiyal CS Rhizosphere competent *Pantoea agglomerans* enhances maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, without altering the rhizosphere functional diversity. Anton. Leeuw. Int. J. G. 2011; 100: 405–413.

16. Mergaert J, UGent LV, Kersters K. Transfer of *Erwinia-ananas* (synonym, *Erwinia-uredovora*) and *Erwinia-stewartii* to the genus *Pantoea* emend as *Pantoea-ananas* (serrano 1928) comb-nov and *Pantoea-stewartii* (smith 1898) comb-nov, respectively, and description of *Pantoea-stewartii* subsp indologenes subsp nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1993; 43: 162–173.



17. Popp A, Cleenwerck I, Iversen C, De Vos P, Stephan R. *Pantoea gaviniae* sp. nov. and *Pantoea calida* sp. nov., isolated from infant formula and an infant formula production environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010; 60: 2786–2792.
18. Rezzonico F, Smits THM, Montesinos E, Frey JE, Duffy B. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiology.* 2009; 9: 204.
19. Sturz AV, Christie BR, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Science.* 2000; 19: 1–30.

Стаття надійшла до редакції 20.08.2018 р.



**Elene Kakabadze^{1,2}, Nata Bakuradze^{1,2}, Nino Grdzlishvili²,
Khatuna Makalatia^{1,2}, Gulnara Natroshvili², Nina Chanishvili²**

¹Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Faculty of Exact and Natural Science,
1, Chavchavdze Ave., 0179 Tbilisi, Georgia

²G. Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology,
3, Gotua str., Tbilisi, 0160, Georgia
tel.: +995 322 374910 e-mail: elene.kakabadze@pha.ge

MICROBIOLOGICAL INVESTIGATION OF ARTISANAL CAUCASIAN YOGURT-LIKE PRODUCT MATSONI

Aim. To investigate microbial composition of the home-made Matsoni samples and select the bacterial cultures for further development of the standardized starter(s), challenging modern biotechnological requirements. **Methods.** Strain isolation and purification, culture evaluation for their catalase and urease activities, casein fermentation, galactose degradation ability, exopolysaccharide (EPS) and bacteriocin production, and lysogeny. **Results.** One hundred forty four lactic acid bacterial cultures were isolated from thirty five homemade Matsoni samples, collected from twenty four different settlements in Georgia during years 2013–2014. Bacterial structure of the starters showed great diversity in their composition, 3% of isolates showed casein degradation and EPS production potential, 32% were positive for galactose fermentation, 19% showed urease activity, 17% revealed antagonistic properties and 14% were denoted as lysogenic. **Conclusions.** The developed strain collection shows potential to provide various organoleptic properties to the end products and, thus, after molecular characterization, can be easily used for construction of new standardized Matsoni starters.

Key words: Lactic acid bacteria, Matsoni, Starter strain, Biotechnology.

Lactic acid bacteria (LAB) is the most important and useful functional group of phylogenetically related bacteria used in dairy industry. Belonging to the order of *Lactobacillales*, phylum *Firmicutes*, vast variety of the LAB strains are granted the status of ‘generally recognized as safe’ (GRAS), meaning they can be applied as food additives or supplements and are commonly used in yogurt, hard chesses, kefir, cultured butter, cottage cheese and sour cream production. Due to LAB metabolic activity, fermented milk products acquire different organoleptic characteristics, hydrolysed proteins, additional vitamins and beneficial lactate, instead of the complex lactose, which may cause digestive problems [7].

The GRAS cultures have to comply to the number of biotechnological characteristics required for the starter strains, including: cultivability, rapid acidification and clot formation in milk, EPS production, phage resistance, galactose fermentation, non-antagonistic activity and enzymatic hydrolysis of casein. The strains that are lysogenic, urease positive and form biogenic amides are not desirable for manufacturing applications.

© Елена Какабадзе, Ната Бакурадзе, Нино Грдзелишвили, Хатуна Макалатия, Гульнара Натрошвили, Нина Чанишвили, 2018



In the industrial fermentation process the majority of the used LAB strains do not utilize galactose moiety of lactose and proceed only with glucose fermentation. Accumulation of galactose in the final product, may lead to domination of undesirable microflora and accumulation of toxic galactitol in the consumer's body. Thereby, the phenotypes expressing Leloir pathway, which dissimilate galactose to Glucose-1-P are in demand [14].

The LAB produce broad range of extracellular saccharides, which can have extended industrial application. The EPS are not permanently attached to the producer cell surface and can be easily harvested. Evolutionary EPS carry protective functions against bacteriophages and may enhance adhesion capability of microbe. In yogurt-like products the EPS production influences clot consistence, making it more firm and stabile. The EPS production and yield highly depends not only on the strain phenotype, but also on the growth conditions and supplements. Usage of higher concentration of several carbohydrates in the growth media enhances overall EPS production of different LAB strains. At the same time sugar enhanced EPS production is strain specific, a distinguished carbohydrate or combination of sugars have to be estimated for each individual strain [13].

The LAB strains may produce variety of different antagonistic agents, that may interfere with fermentation process, such as: bacteriocins, benzoic acid, biogenic amines, high concentration of lactic acid or hydrogen peroxide. In particular bacteriocins, the short peptide chains that carry antibiotic like properties, may have specific actions against food borne pathogens or undesirable flora. Therefore, bacteriocin producing cultures gain increasing interest as probiotic vectors. For example, nisin - the type A lantibiotic, produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* is well characterized bacteriocin, that is extensively used as natural food preservative [5].

Urease activity is one of the undesirable characteristics of starter cultures related to *S. thermophilus*. Enzymatic hydrolysis of urea (if presented in milk in average 0.2–0.4 g l⁻¹) not only significantly slows down the acidification process, but may also have a toxic effect, due to accumulation of NH₃ in the final product [10].

The starter strains may be susceptible to phages that are present in manufacturing environment, or undergo induction during fermentation process in case of lysogenic starter strains that carry temperate bacteriophages (prophages) in their genome. Phage-bacteria interaction or activation of prophage may occur at any time, temperate phages may switch to lytic cycle, start multiplying and cause burst of the host cell, spreading infection to the whole batch. Phage outbreaks can cause serious financial and quality damage to the manufacturing process, even a delay of production for many months [2]. Therefore, the strains should be tested on prophage induction and phage resistance before potential manufacturing use.

In industry of yogurt-like products *Lactobacillus* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* cultures are generally utilized for manufacturing of stirred or drinking yogurt. For instance, traditional starter set for Balkan yogurt is composed of *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *S. thermophilus*, (2.5–6 h long fermentation); for mild yogurt preparation protosymbiotic, thermophilic cultures of *L. acidophilus* and *S. thermophiles* (6–7 h fermentation) are used. Probiotic yogurt-



like products usually contain strains of *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, along with *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, and *B. infantis* [9].

From the vast variety of traditional dairy foods produced in Georgia, Matsoni has a special place in everyday diet of the local population, especially in child nutrition. Matosni is white, smooth, semi-liquid, yogurt like fermented product, common in every part of the country. It can be made from cow, buffalo, sheep and goat milk, or their mixtures. Products final acidity ranges around 70–150°T. Overall, the microbial ecosystem of Matsoni is considered to be largely dominated by the thermophilic species: *S. thermophilus* and *L. delbrueckii*. High density of LAB other than these two species, including *L. helveticus*, *L. paracasei* and *Leuconostoc lactis*, were found to occur as well [11].

At present all Georgian traditional products including yogurt-like product Matsoni actually are made using the replacement cultures imported from different countries. The products manufactured using these starters resembles Matsoni, but still there are great differences in texture, flavour and taste in comparison with the traditional Georgian product.

Due to peculiarity of the preparation method, based on back-sloping, uncontrolled usage and marketing of imported starter cultures, strains migrate from commercial products to home-made batches, replacing established semi-spontaneous mother cultures. Thus, preserving natural starter composition of traditional Matsoni is of a great importance.

As a measure directed to preservation of the tradition the artisanal method for preparation of Matsoni was adapted and published by Georgian patent agency (Table 1) [15].

Table 1

Standard manufacturing protocol of Matsoni according to Saqpatenti [15]

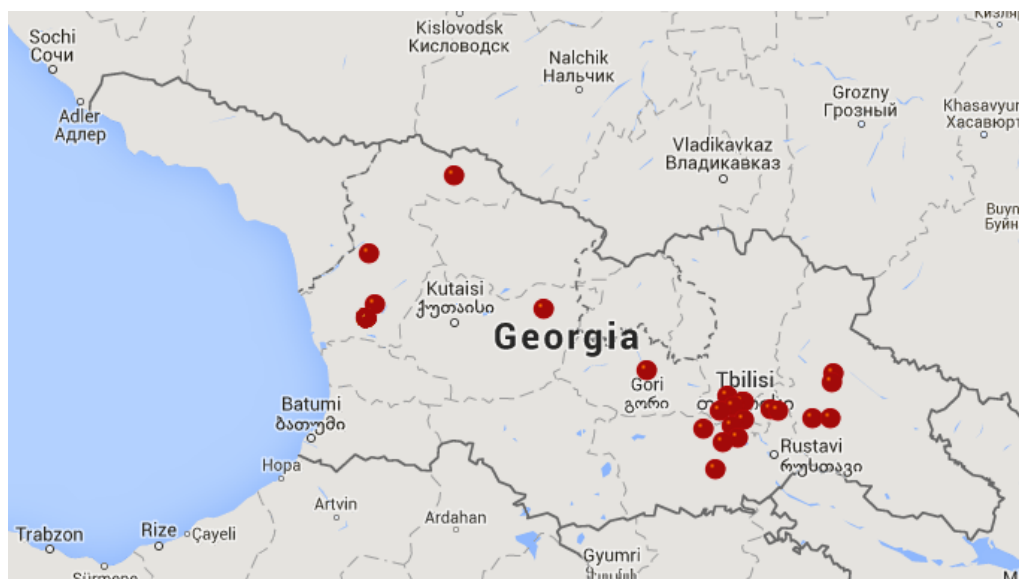
Matsoni		
Manufacturing		Comments
Milk heat treatment	—————	Pasteurization
Inoculation of Starter	—————	Back-sloping
Fermentation	—————	41–45 °C, 3–4 h
Cooling	—————	4–6 °C, 12–20 h

The present study focuses on determination of microbial composition of the home-made Matsoni samples, selection of the bacterial cultures with distinguished biotechnological potential for further molecular investigation and development of the standardized starter(s) for the traditional Caucasian dairy product(s).



Materials and methods

Fresh home-made Matsoni samples were collected from twenty four different points in Georgia during 2013–2014 (Picture 1). The samples were immediately transferred to the research laboratory in cooler boxes. 10ml of sample was taken aseptically from Matsoni jars for further investigation. For obtaining diversity of viable and cultivable, acidifying and lactose-fermenting LABs, the strain isolation was performed according to the method described by D. Carminati et al. (2014) [3].



Picture 1. Pinpoints of the sample collection sites in Georgia

Morphologically different colonies were isolated and purified by streaking on the respective solid media (MRS, M17, Bile Esculin Azide Agar). The obtained pure colonies were checked for catalase activity by applying 3% hydrogen peroxide on the strain colony, Gram staining was performed using the differential staining kit (Deltalab) according to manufacturer's instructions, after which the samples underwent light microscopy (X1000) for morphological classification. After purification the stocks were stored at -80 °C with 20% glycerol. Prior to use the strains were cultivated twice in appropriate liquid media.

Galactose fermentation test was carried out on BSM medium, with phenol red (final concentration of 2% w/v) and filter sterilized D-(+) Galactose – 0.2% (w/v) as described by De Man et al (1960) [4].

The LAB isolates were tested for the ability to digest casein using standard skim milk agar plate method.

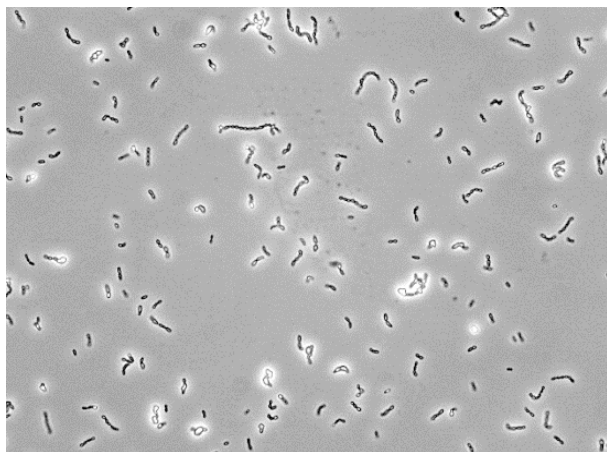
Study of lysogeny was performed via spot test and induction of prophages using Mitomycin C, as described by Ra'1, R. Raya and Elvira M. H'bert (2009) [12].

Ability of the EPS production was evaluated in presence of carbohydrate composition (5.26~5.1 lactose g/100g) of normal milk to model the strain behavior

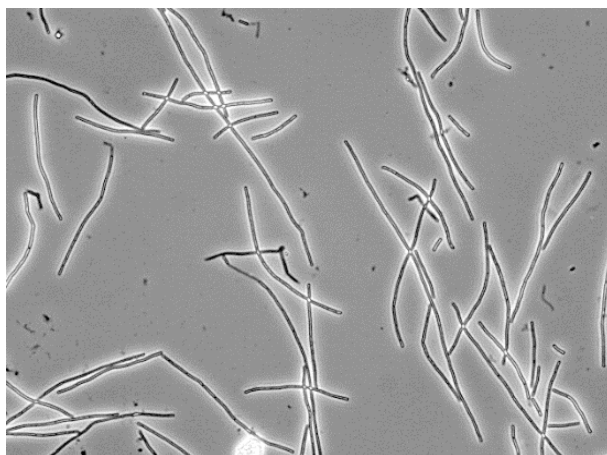


at manufacturing conditions, according to the method described by Ruas-Madiedo, P. and De Los Reyes-Gavilán, C. G. (2005) [13]

Urease activity test was performed as follows: a pellet was obtained from 2ml of overnight culture via centrifuging (10,000rpm, 5min), re-suspended in 2ml of the indicator solution (yeast extract -0.1g, KH_2PO_4 -9.1G, K_2HPO_4 -9.5g, phenol red-0.01g, 1L D.W. pH 6.5, filter sterilized) and incubated for 6–18h at 42 °C.



Picture 2. Presumptive *Lactobacillus* spp. culture, isolated from Matsoni sample, Light Microscopy, live culture in MRS medium, magnification 100X



Picture 3. Presumptive *Streptococcus thermophilus* culture, isolated from Matsoni sample, Light Microscopy, live culture in M17 medium, magnification 100X

Screening of bacteriocin producing strain was performed as follows: overnight cultures were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, supernatant was removed and stored at -20 °C until further use. Standard indicator strains: *L. plantarum* 350 and *L. sakei subsp. sakei* JCM 1157 (Kindly provided by T. Haertle (FIP, UR1268, Biopolymers Interactions Assemblies, INRA, BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3,

France.) were used as a bacteriocin sensitive lawn. 200µl of log phase indicator strains were mixed with 25ml of 1% MRS agar and plated on sterile Petri dish. Plates were allowed to dry and Ø8mm wells were cut and filled with 65µl of the supernatant. After aerobic incubation for 18h at 37 °C, the plates were checked for appearance of clear zones. *Enterococcus durans* A5-11 [1] was used as a positive control. The strains demonstrating positive-reactions were selected for further studies. The selected supernatants were pH neutralized, hold in water bath for 10 min to exclude high acid production and H₂O₂ effects. Additionally the samples were treated with proteinase K and trypsin (1mg/ml for 90min) to confirm peptide nature of inhibitory agents.

Results and discussion

A total of 144 LAB strains were isolated from 35 fresh Matsoni samples. It is important to underline that the majority of the home-made samples contained vast variety of yeast microflora, with average of 4 bacterial isolates per sample, with sample standard deviation of 1.75, suggesting high variability among different samples. Based on the results obtained using various selective media, temperature conditions, catalase activity tests, Gram profiles and cell morphology eighty two strains were attributed to *Lactobacillus spp.* four cultures to *S. thermophilus* and fifty eight isolates to *Enterococcus spp.*

According to the screening results five isolates attributed to *Lactobacillus spp.* showed ability to degrade casein, which was demonstrated by skim milk agar plate method. Forty six (32%) out of 144 isolates have been determined as positive for galactose fermentation and five isolates formed mucoid or ropy colonies on Milk agar. Twenty eight isolates (19%) appeared to be urease positive.

A total of 144 isolates have been tested for lysogeny. Despite the fact that no lysis areas or negative colonies were detected via the spot-test analysis, twenty strains showed decrease of turbidity after induction with Mitomycin C, compared to their controls and, therefore, have to be excluded from the list of the biotechnologically suitable strains.

The isolates have been checked for antagonistic activity against *L. plantarum* 350 and *L. sakei subsp. sakei* JCM 1157. Two isolates attributed to *Lactobacillus spp.* and one to *Enterococcus spp.* showed distinguished antagonistic activity characteristic to bacteriocin production, while twenty one strains showed inter-genus antagonistic activity, which is determined by non-peptide factors. Thus, these cultures may not be recommended as potential starter strains, as they may interfere with development of other starter components.

After summarizing the screening results per each isolate according to the characteristics discussed in introduction, sixty five isolates have been validated as suitable candidates as potential starter strains and use for further molecular characterization.



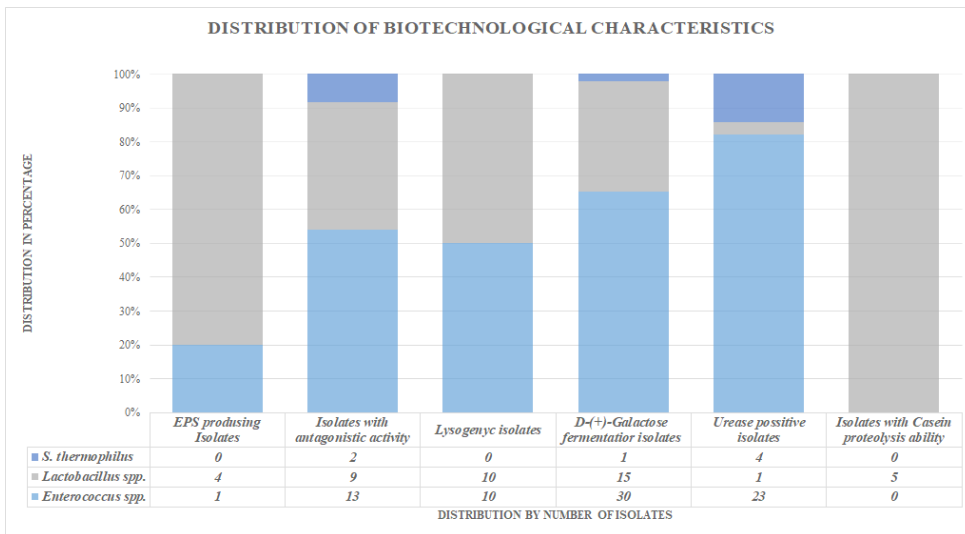


Figure 1. Distribution of different trades of Matsoni isolates

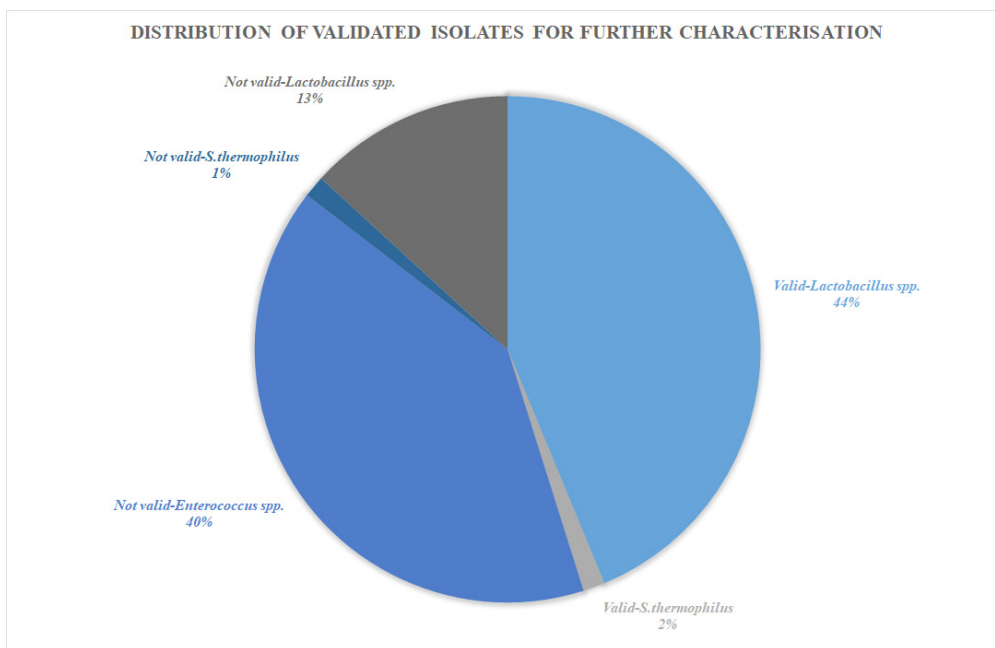


Figure 2. Validation of isolates as potential starter cultures

Concluding remarks

144 lactic acid bacterial strains isolated from the artisanal Matsoni samples were evaluated from biotechnological point of view. 3 strains demonstrated an ability to produce bacteriocines, because of which they were excluded from the list of potential starters, but they can find other alternative uses, e.g as antimicrobial agents. The developed strain collection, counting 65 isolates, demonstrating valuable biotechnological properties, such as galactose fermentation, EPS production and casein degradation will undergo thorough molecular characterization, after which can be easily used for construction of the new Matsoni starters. A large body of information on diversity and metabolic activities of bacterial species isolated from artisanal Matsoni will allow to predict how to develop future regulatory requirements necessary to protect and preserve natural microbiota of artisanal products.

High frequency of occurrence of *Enterococcus spp.* in Matsoni samples suggests the importance of further investigation of their role in fermentation process and their role in development of the product taste. But as it was shown in previous study by Malkhazova et al. (2005) [8] a high percentage of *Enterococcus* isolates from Matsoni demonstrates an ability to decarboxylate tyrosine to tyramine, and may be associated with certain health hazards. Additionally, recent emergence of antibiotic resistance and virulent strains of *Enterococcus spp.* and their ability to horizontally transform resistance genes cause serious concerns on their use from food safety point. Therefore, the inclusion of *Enterococcus* species adding into the starter composition should be done with caution.

Элена Какабадзе^{1,2}, Ната Бакурадзе^{1,2},
Нино Грдзелишвили², Хагуна Макалатия^{1,2},
Гульнара Натрошвили², Нина Чанишвили²

¹Тбилисский государственный университет им. Иване Джавахишвили,
факультет точных и естественных наук, пр. Чавчавадзе, 1, 0179 Тбилиси, Грузия

²Институт бактериофагии, микробиологии и вирусологии им. Г. Элиавы,
ул. Готуа, 3, 0160, Тбилиси, Грузия

тел.: +995 322 374910 e-mail: elene.kakabadze@pha.ge

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАВКАЗСКОГО ПРОДУКТА МАЦОНИ

Реферат

Цель работы. Изучить микробный состав самодельных образцов мацони и выбрать бактериальные культуры для дальнейшего развития стандартизованного стартера. **Методы.** Выделение и очистка штаммов, оценка каталазной и уреазной активности культуры, оценка способности ферментации казеина, деградации галактозы, производство экзополисахаридов и бактериоцинов, определение лизогенных штаммов. **Результаты.** Было выделено сто сорок четыре молочнокислых бактериальных культур из 35 самодельных образцов Мацони, собранных из 24 различных поселений в Грузии в течение 2013–2014 гг. Бактериальная структура стартеров показала большое разнообразие в их составе, 3% изолятов показали способность деградировать казеин и производить экзополисахариды, 32% – ферментировать галактозу, 19% проявили уреазную активность, 17% – показали анта-



гонистическую активность и 14% были обозначены как лизогены. **Выводы.** Разработанная коллекция штаммов имеет потенциал для обеспечения различных органолептических свойств конечным продуктам и, таким образом, может быть использована для новых стандартизированных стартеров Мацони.

Ключевые слова: Lactic acid bacteria, Matsoni, Starter strain, Biotechnology.

**Елена Какабадзе^{1,2}, Ната Бакурадзе^{1,2},
Ніно Грделішвілі², Хатуна Макалатія^{1,2},
Гульнара Натрошвілі², Ніна Чанішвілі²**

¹Тбіліський державний університет ім. Івана Джагашвілі,
факультет точних і природничих наук, пр. Чавчавадзе, 1, 0179 Тбілісі, Грузія

²Інститут бактеріофагії, мікробіології і вірусології ім. Г. Еліаві,
вул. Готуа, 3 0160, Тбілісі, Грузія

тел.: +995 322 374910 e-mail: elene.kakabadze@pha.ge

МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ КАВКАЗЬКОГО ПРОДУКТА МАЦОНИ

Реферат

Мета. Вивчити мікробіний склад саморобних зразків Мацони і вибрати бактеріальні культури для подальшого розвитку стандартизованого стартера.

Методи. Виділення і очищення штамів, оцінка каталазної і уреазної активності культури, оцінка здатності ферментації казеїну, деградації галактози, синтез екзополіцукридів і бактеріоцинів, визначення лізогенних штамів.

Результати. Було виділено сто сорок чотири молочнокислих бактеріальних культури з 35 саморобних зразків Мацони, відібраних з 24 різних поселень в Грузії протягом 2013 – 2014 рр. Бактеріальна структура стартерів показала велику різноманітність в їх складі, 3% ізолятів показали здатність деградувати казеїн і синтезувати екзополіцукриди, 32% - ферментувати галактозу, 19% виявили уреазну активність, 17% - показали антагоністичну активність і 14% були визначені як лізогени. **Висновки.** Розроблена колекція штамів має потенціал для забезпечення різних органолептичних властивостей кінцевим продуктам і, таким чином, може бути використана для нових стандартизованих стартерів Мацони.

Ключові слова: Lactic acid bacteria, Matsoni, Starter strain, Biotechnology.

References

1. Belguesmia Y., Choiset Y., Rabesona H., Baudy Floc'h M., Le Blay G., Haertlé T., Chobert J.M. Antifungal properties of durancins isolated from *Enterococcus durans* A5-11 and of its synthetic fragments // Lett. Appl. Microbiol. – 2013, – 56(4), – P. 237–244.

2. Brussow H., Fremont M., Bruttin A., Sidoti J., Constable A., Fryder V. Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – 60(12), –P. 4537–4543.



3. Carminati D., Tidona F., Fornasari M.E., Rossetti L., Meucci A., Giraffa G. Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk // Lett. Appl. Microbiol. – 2014. – 59(3), – P. 299–305.
4. De Man J.C., Rogosa D., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of *lactobacilli* // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – 23(1), – P. 130–135.
5. Hansen J.N., Sandine W.E. Nisin as a model food preservative // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 1994. – 34(1), – P. 69–93.
6. Heller K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms // Am. J. Clin. Nut. – 2001. – 73(2), – P. 374s–379s.
7. Kinová S.H., Bilková A., Bukovský M. *Lactobacilli* and their probiotic properties//LC-GC Czech Pharm. Soc. Slovak Pharm. – 2008. – 57(2), – P. 95–98.
8. Malkhazova Y., Chanishishvili N., Aleksidze N., Parente E. Technological and biochemical properties of *enterococci* isolated from lactic acid products// NTZ Bull. Acad. Agric. Sci. –2005 -0869-3730 N1. – P. 66–69.
9. Michaylova M., Minkova S., Kimura K., Sasaki T., Isawa K. Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – 269(1), –P. 160–169.
10. Mora D., Fortina M. G., Parini C., Ricci G., Gatti M., Giraffa G., Manachini P. L. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products // J. Appl. Microbiol. – 2002. – 93(2), – P. 278–287.
11. Quero G. M., Fusco V., Cocconcelli P. S., Owczarek L., Borcakli M., Fontana C., Morea M. Microbiological, physico-chemical, nutritional and sensory characterization of traditional Matsoni: selection and use of autochthonous multiple strain cultures to extend its shelf-life // Food microbiol. –2014. – 38, – P. 179–191.
12. Ra'l R. R., H'bert, E. M. Isolation of phage via induction of lysogens-Guelph, Canada: Humana Press, 2009. 23–32 p.
13. Ruas-Madiedo P., De Los Reyes-Gavilán C.G. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria // J. Dairy Sci. – 2005. – 88(3), – P. 843–856.
14. Turner K.W., Martley F.G. Galactose fermentation and classification of thermophilic *lactobacilli* // Appl. Environ. Microbiol. –1983. – 45(6), – P. 1932–1934.
15. http://www.sakpatenti.org.ge/index.php?lang_id=ENG&sec_id=325&lang_id=GEO. 18 July 2018

This study was performed with support of following grant programs:

CRDF - A 60792

SRNSF- DO/311/7-280/14

There is no conflict of interest between the authors

Стаття надійшла до редакції 28.01.2018 р.



УДК579.222.3

А. Г. Мерліч, Н. В. Коротаєва

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна, 65082;
тел. +38(0482)68 79 64; e-mail: andriymerlich@gmail.com

СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ БАКТЕРІЙ ШТАМУ *ENTEROCOCCUS ITALICUS* ОНУ547

Мета. Визначення складу жирних кислот бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 продуцента бактеріоцину та його попередньої ідентифікації. **Методи.** У роботі використовували штам *E. italicus* ОНУ547, який було виділено з ферментованої капусти з Таїланду. Бактерії культивували на 1,5% агаризованому середовищі *de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)*. Жирнокислотний склад бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 визначали за допомогою газового хроматографа *Agilent 7890*, оснащеного колонкою *Ultra 2 (25 м x 0,2 мм)* (*Agilent Technologies*, Санта-Клара, Каліфорнія, США) з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів *MIDI Sherlock*. **Результати.** Вперше показано, що домінуючими жирними кислотами бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 є октадеценоні кислоти (61,52%). Гексадеканова кислота також присутня у відносно високій концентрації та складала 26,41% від загальної кількості. Інші виявлені жирні кислоти ($C_{17:0}$, $C_{20:1}$ w7c, $C_{12:0}$, $C_{19:0}$ цикло w8c, $C_{18:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:1}$) присутні в значно менших кількостях, та складала від 0,18% до 6,30%. **Висновки.** У складі ліпідів досліджуваних бактерій переважають ненасичені жирні кислоти. За спектром жирних кислот досліджувані бактерії віднесено до виду *E. italicus*.

Ключові слова: жирні кислоти, газова хроматографія, *E. italicus* ОНУ547.

Вперше представника молочнокислих бактерій виду *Enterococcus italicus* було виділено та описано відносно недавно. В якості характерних ознак бактерій цього виду відмічено здатність до слабого росту при температурі 10 °C та нездатність зростати в присутності 6,5% NaCl, відсутність пігментоутворення, нездатність утилізувати деякі цукри. Домінуючими жирними кислотами є $C_{18:1}$ w7c та $C_{16:0}$ [3]. Дослідниками було показано перспективи застосування бактерій цього виду у харчовій промисловості [4].

У попередніх дослідженнях з ферментованої капусти (Таїланд) нами було виділено штам *E. italicus* ОНУ547 продуцент бактеріоцину, що також проявляв властивості, які вказують на можливість його застосування у харчовій промисловості. Належність виділеного штаму до виду *E. italicus* було встановлено на основі результатів секвенування 16S рДНК [1]. Однак для надійної ідентифікації бактерій бажано використовувати різні підходи, що включають класичні мікробіологічні методи, генетичний аналіз та методи хемотаксономії [7], серед яких інформаційним вважається порівняння спектрів жирних кислот [3]. У зв'язку з цим метою роботи було визначення спектру жирних кислот бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 та підтвердження його попередньої ідентифікації.



Матеріали і методи

У роботі використовували штамп бактерій *E. italicus* ОНУ547, який було виділено нами з ферментованої капусти Таїланду та попередньо ідентифіковано на основі результатів секвенування 16S рДНК [1]. Бактерії культивували на 1,5% агаризованому середовищі de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) за температури 28 °С.

Аналіз складу жирних кислот було виконано згідно з [5]. Підготовку проб здійснювали в декілька етапів. Спочатку, з метою здійснення омилення, до біомаси добової культури бактерій додавали 1 мл реагенту № 1 (NaOH – 45 г, метанол – 150 мл, дейонізована дистильована вода – 150 мл), перемішували на вортексі впродовж 5–10 сек і прогрівали при 100 °С впродовж 5 хв. Потім, знову перемішували на вортексі, прогрівали при 100 °С впродовж 25 хв і охолоджували. Для здійснення метилування додавали 2 мл реагенту № 2 (6Н HCl – 325 мл, метанол – 275 мл), перемішували на вортексі впродовж 5–10 сек, прогрівали на водяній бані за 80 °С впродовж 10 хв і швидко охолоджували. Наступним етапом було екстрагування жирних кислот шляхом додавання 1,25 мл реагенту № 3 (гексан – 200 мл, метил-трет-бутиловий етер – 200 мл) та перемішування впродовж 10 хв, після чого суміш розділялась на дві фракції. До відібраної верхньої фракції, з метою здійснення промивання, додавали 3 мл реагенту № 4 (NaOH – 10,8 г, дейонізована дистильована вода – 900 мл), перемішували впродовж 5 хв і відбирали верхню фракцію, яка містила виділені жирні кислоти [8].

Газову хроматографію виконували за допомогою хроматографа Agilent 7890, який оснащений колонкою Ultra 2 з 5% фенілметилсилоксану (25 м x 0,2 мм) (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія, США). В якості рухомої фази використовували водень [8].

Результати та їх обговорення

У результаті проведених досліджень вперше виявлено, що до складу клітин бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 входять як насичені так і ненасичені жирні кислоти (табл.).

Серед насичених виявлено додеканову ($C_{12:0}$), тетрадеканову ($C_{14:0}$), гексадеканову ($C_{16:0}$), гептадеканову ($C_{17:0}$), октадеканову $C_{18:0}$ та циклопропанову ($C_{19:0}$ цикло w8c) кислоти, тоді як серед ненасичених – суміш гексадеценоних кислот ($C_{16:1}$ w7c/ $C_{16:1}$ w6c), суміш октадеценоних кислот ($C_{18:1}$ w7c/ $C_{18:1}$ w6c) та ейкозенову кислоту ($C_{20:1}$ w7c). Загалом насичені жирні кислоти бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 складають 31,7% від загальної кількості екстрагованих, тоді як ненасичених – 68,3%. При порівнянні вмісту насичених та ненасичених жирних кислот їх співвідношення складає приблизно 1:2, отже, в складі клітин досліджуваного ентерококу переважають ненасичені жирні кислоти.

Аналіз складу ненасичених жирних кислот клітин *E. italicus* ОНУ547 виявив, що найбільший вміст серед них має суміш $C_{18:1}$ w7c/ $C_{18:1}$ w6c (90%), тоді як суміші $C_{16:1}$ w7c/ $C_{16:1}$ w6c та $C_{20:1}$ w7c наявною є в значно меншій кількості та складають 9,2% та 0,8%, відповідно. Серед насичених жирних кислот у найбільшій кількості представлені $C_{16:0}$ (83,4%) та $C_{14:0}$ (7,8%). Жирні кислоти $C_{12:0}$, $C_{17:0}$, $C_{18:0}$ та $C_{19:0}$ цикло w8c присутні в значно меншій кількості



та складають лише 2%, 0,6%, 3,7% та 2,4% від загальної кількості насичених жирних кислот, відповідно.

Таблиця

Склад жирних кислот бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547

Table

Composition of fatty acids of bacteria of the strain *E. italicus* ONU547

Час утримання, хв	Жирна кислота	Частка (%)
0,7137	-	-
0,7345	Пік сольвента	-
1,6165	12:0	0,65
2,0333	-	-
2,1169	-	-
2,1643	14:0	2,47
2,4709	15:0	-
2,7351	16:1 w7c/16:1 w6c 16:1 w6c/16:1 w7c	6,30
2,7676	-	-
2,7857	16:0	26,41
3,1027	17:0	0,18
3,3696	18:1 w7c 18:1 w6c	61,52
3,4171	18:0	1,18
3,7041	19:0 cyclo w8c	0,77
3,9832	20:1 w7c	0,52

Аналіз сумарного складу насичених і ненасичених жирних кислот клітин бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 показав, що суміш октадеценних жирних кислот домінує серед інших та складає 61,52%, а гексадеканова і циклопропанова – 26,41% і 0,77%, відповідно (рис.). Отримані нами результати повністю узгоджуються з даними наведеними у єдиній відомій публікації що до складу жирних кислот у *E. italicus*. У типового штаму *E. italicus* TP1.5^T домінують жирні кислоти C_{18:1} (60,6%) та C_{16:0} (27,9%), тоді як жирні кислоти C_{19:0} виявлені у меншій кількості – лише 2,5% [3].

Оскільки штам *E. italicus* ОНУ547 ізольовано нами із рослинного матеріалу [1], а штам *E. italicus* TP1.5^T було виділено із молочних продуктів [2, 3] то узгодження результатів їх жирнокислотного складу може вказувати на те, що він не залежить від джерела виділення. Це підтверджує можливість для надійного застосування аналізу складу жирних кислот для ідентифікації бактерій виду *E. italicus*.

Склад жирних кислот (особливо визначення складу C16:1) може бути також використаний для розмежування видів *E. italicus* та *E. camelliae*, оскільки ці два види ентерококів мають високу схожу послідовність нуклеотидів



гену 16S рРНК (на 99,2%) [6]. У наших дослідженнях концентрація ненасичених жирних кислот $C_{16:1}$ у *E. italicus* ОНУ547 складала лише 6,3% від загальної кількості виділених жирних кислот, тоді як для *E. camelliae* FP15-1^T їх концентрація складає 30,5%. Крім того, концентрація іншої головної жирної кислоти – $C_{18:1}$ була значно меншою для *E. camelliae* FP15-1^T (20,9%) [6].

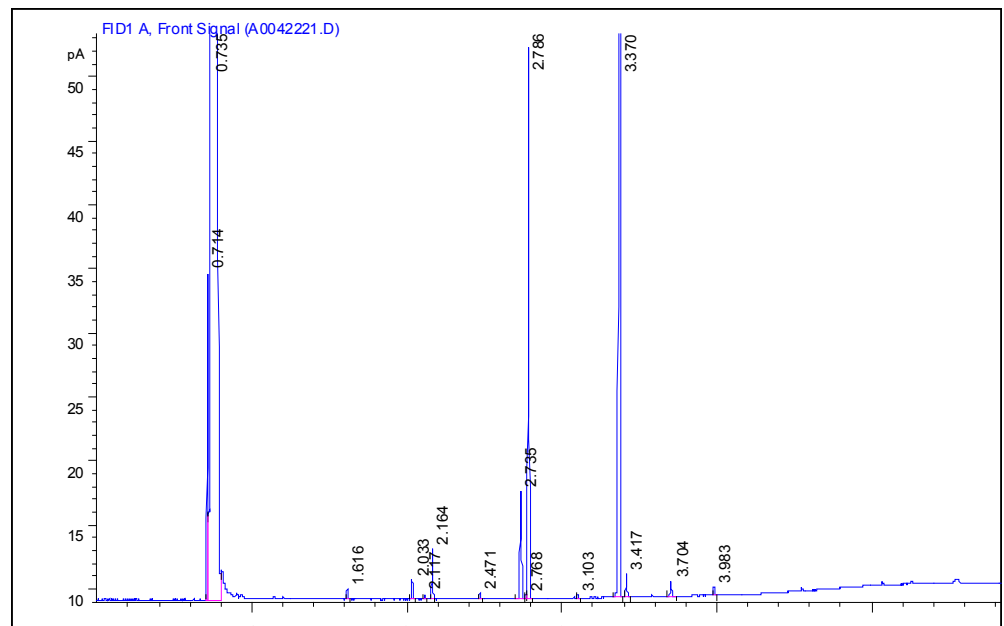


Рис. Хроматограма спектру жирних кислот бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547

Fig. Chromatogram of the fatty acid spectrum of bacteria of the strain *E. italicus* ONU547

Незважаючи на те, що інші жирні кислоти, такі як $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{17:0}$, $C_{18:0}$ та $C_{20:1}$ також є у складі клітин *E. italicus* ОНУ547, як і у *E. camelliae* FP15-1^T [6], проте вони визначені в значно меншій кількості та складають, відповідно, 0,65%, 2,47%, 0,18%, 1,18% та 0,52% від загальної кількості виділених жирних кислот.

Отже, проведені дослідження показали, що спектр жирних кислот бактерій *E. italicus* може слугувати важливою характеристикою цього виду і ознакою, яка диференціює його від генетично близького за послідовністю нуклеотидів 16S рРНК виду *E. camelliae*.

А. Г. Мерлич, Н. В. Коротаева

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, Украина, 65082,
тел. +38(0482)68 79 64, e-mail: andriymerlich@gmail.com

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ БАКТЕРИЙ ШТАММА *ENTEROCOCCUS ITALICUS* ONU547

Реферат

Цель. Определение состава жирных кислот бактерий штамма *E. italicus* ONU547 продуцента бактериоцина и его первичной идентификации. **Методы.** В работе использовали штамм *E. italicus* ONU547, который было выделено из тайской ферментированной капусты. Бактерии культивировали на 1,5% агаризованной среде de Man, Rogosa and Sharpe (MRS). Жирнокислотный состав бактерий штамма *E. italicus* ONU547 определяли с помощью газового хроматографа Agilent 7890, оборудованного колонкой Ultra 2 (25 м x 0,2 мм) (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США) с использованием автоматической системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock. **Результаты.** Впервые показано, что доминирующими жирными кислотами бактерий штамма *E. italicus* ONU547 являются октадеценовые кислоты (61,52%). Гексадекановая кислота также присутствует в относительно высокой концентрации и составляла 26,41% от общего количества. Другие выявленные жирные кислоты ($C_{17:0}$, $C_{20:1}$ w7c, $C_{12:0}$, $C_{19:0}$ цикло w8c, $C_{18:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:1}$) присутствуют в значительно меньших количествах и составляли от 0,18% до 6,30%. **Выводы.** В составе липидов исследуемых бактерий преобладают ненасыщенные жирные кислоты. За спектром жирных кислот исследуемые бактерии отнесены к виду *E. italicus*.

Ключевые слова: жирные кислоты, газовая хроматография, *E. italicus* ONU547.

A. G. Merlich, N. V. Korotaieva

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvorianska str., Odesa, Ukraine, 65082,
tel.: +38(0482)68 79 64, e-mail: andriymerlich@gmail.com

FATTY ACID COMPOSITION OF BACTERIA OF *ENTEROCOCCUS ITALICUS* ONU547 STRAIN

Summary

Aim. Determination of fatty acid composition of bacteria of bacteriocin producing the strain *E. italicus* ONU547 and of its preliminary identification. **Methods.** The strain *E. italicus* ONU547, isolated from Thai fermented cabbage was used in the work. The bacteria were cultivated on the medium de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) with 1.5% agar. The fatty acid composition of bacteria of *E. italicus* ONU547 strain was determined by gas chromatograph Agilent 7890 equipped with Ultra 2 column (25 m x 0,2 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) using the automatic system of identification of microorganisms MIDI Sherlock. **Results.** Octadecenoic acids are dominating fatty acids (61.52%)



of bacteria of *E. italicus* ONU547 strain and it has been showed for the first time. Hexadecanoic acid is also present at relatively high concentration and comprised 26.41% from total amount. Other detected fatty acids ($C_{17:0}$, $C_{20:1}$, $C_{12:0}$, $C_{19:0}$, cyclo w8c, $C_{18:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:1}$) are present in much lower quantities and comprised from 0.18% to 6.30%. **Conclusions.** Unsaturated fatty acids are predominant in lipid composition of the studied bacteria. The studied bacteria were identified as *E. italicus* based on the spectrum of fatty acids.

Key words: fatty acids, gas chromatography, *E. italicus* ONU547.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Мерліч А. Г., Галкін М. Б., Ліманська Н. В., Швазе І., Ертеле Т., Іваниця В. О. Характеристика бактеріоцину *Enterococcus italicus* ONU547, виділеного з квашеної капусти Таїланду // XV з'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (Одеса, 11–15 вересня, 2017 р.): тез. доп. – Львів: “Сполом”, 2017. – С. 281.
2. Fortina M.G., Ricci G., Acquati A., Zeppa G., Gandini A., Manachini P.L. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese // Food Microbiol. – 2003. – V. 20. – P. 397–404.
3. Fortina M.G., Ricci G., Mora D., Manachini P.L. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – V. 54. – P. 1717–1721.
4. Gaaloul N., Braiek O.B., Berjeaud J.M., Arthur T., Cavera V.L., Chikindas M.L., Hani K. and Ghrairi T. Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of *Enterococcus italicus* GGN10 strain isolated from Tunisian bovine raw milk // J. Food Saf. – 2014. – V. 34 – P. 300–311.
5. *Methods in Microbiology* / Eds F. Rainey and A. Oren. Academic Press, 2011.
6. Sukontasing S., Tanasupawat S., Moonmangmee S., Lee J.-S. and Suzuki K. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – V. 57. – P. 2151–2154.
7. Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., and Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics // Microbiol. Rev. – 1996. – V. 60, № 2. – P. 407–438.
8. http://www.midi-inc.com/pdf/Sherlock_MIS_Operating_Manual.pdf.

Reference

1. Merlich AG, Galkin MB, Limanska NV, Choiset I, Haertlé T, Ivanytsia VO. Characterization of bacteriocin from *Enterococcus italicus* ONU547, isolated from Thai fermented cabbage. XV Congress of the S.M. Vynogradskyi Society of Microbiologists of Ukraine (Odesa, 11-15 September, 2017): book of abstracts, Lviv, Spolom, 2007:281 (In Ukrainian).
2. Fortina MG, Ricci G, Acquati A, Zeppa G, Gandini A, Manachini PL. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. Food Microbiol. 2003;(20):397-404.



3. Fortina MG, Ricci G, Mora D, Manachini PL. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004;(54):1717-1721. doi: 10.1099/ijs.0.63190-0.

4. Gaaloul N, Braiek OB, Berjeaud JM, Arthur T, Cavera VL, Chikindas ML, Hani K and Ghrairi T. Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of *Enterococcus italicus* GGN10 strain isolated from Tunisian bovine raw milk. J. Food Saf. 2014;(34):300-311. doi:10.1111/jfs.12126.

5. Methods in Microbiology / Eds F Rainey and A Oren. Academic Press, 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00020-6>.

6. Sukontasing S, Tanasupawat S, Moonmangmee S, Lee J-S and Suzuki K. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007;(57):2151-2154. doi:10.1099/ijs.0.65109-0.

7. Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, and Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 1996;(60):407-438.

8. http://www.midi-inc.com/pdf/Sherlock_MIS_Operating_Manual.pdf.

Стаття надійшла до редакції 27.08.2018 р.



M. D. Shtenikov, A. M. Ostapchuk, V. O. Ivanytsia

Odesa National I.I. Mechnykov University,
2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: shtenikovnik@gmail.com

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF ENDOSPOREFORMING BACTERIA OF DEEP WATER THE BLACK SEA SEDIMENTS

Aim. The purpose of the work was to study the antagonistic activity of strains of the facultatively anaerobic endosporeforming bacteria, isolated from deep-sea sediments of the Black Sea. **Materials and methods.** In this work, 250 strains of facultative anaerobic endosporeforming bacteria, isolated from the samples of deep-sea sediments of the Black Sea, were used. Antagonistic activity was determined by the method of radial streaks. As indicators for screening there were used next strains of opportunistic human pathogens – *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* B-329, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Bacillus subtilis* ATCC 10774. **Results.** It is revealed that 32% of all isolated Black Sea strains of facultative anaerobic spore-forming bacteria have been shown to exhibit antagonistic activity of varying degrees of severity in relation to opportunistic microorganisms. There is a certain relationship between species strain, horizon of its origin and its antagonistic activity. **Conclusions.** The obtained results testify to the promising nature of the strains of endospore-forming bacteria in the Black Sea sediments for the screening of the producers of antimicrobial compounds with activity directed against opportunistic human pathogens.

Key words: endosporeforming bacteria, antimicrobial activity, the Black sea.

Most studies which focus on the antagonistic interactions of microorganisms relate to microorganisms in soil origin. The marine environment is much less explored in this aspect, and it can serve as a promising source for the search for new producers for biotechnological research. This is especially true of such specific part of the World Ocean as the Black sea, in which water from the depth of 100–150 m is saturated with hydrogen sulfide and characterized by anaerobic conditions, which makes this biotop unique [10]. Therefore, we can expect to discover in this environment new types of antagonistic activity and microorganisms – the producers of new antibiotics. The search for and development of new antimicrobial drugs is important for the control of poliresistant pathogens [3, 6, 7, 8].

The study of antagonistic activity in strains of bacteria of natural origin is interesting not only from the applied, but also from the fundamental point of



view – it gives an idea of the nature and extent of the potency of the competitive relationships in the biotope from which the bacteria-antagonists are isolated [5, 6].

For the first time in the bottom deposits of anaerobic, saturated hydrogen sulfide and methane, batially of the Black sea at depths 888–2080 m, we identified facultative anaerobic endosporeforming bacteria, their taxonomic diversity was determined, and assumptions were made about their alochtonic origin [2]. It was established that the isolated strains belong to 18 species of 4 genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* and *Brevibacillus*. Proceeding from the hypothesis of the alochtonic origin of these bacteria in the bottom sediments of the Black sea, we can assume the correlation of the antagonistic profiles of the strains obtained with such soils for bacteria of soil origin.

The aim of the work was to study the antimicrobial activity of the strains of the facultatively anaerobic endosporeforming bacteria, isolated from the deep sea sediments of the Black sea and to find strains promising for the search for new antibiotics.

Materials and methods

250 strains of facultatively anaerobic endosporeforming bacteria of genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, isolated from samples of deep-sea bottom sediments of the Black Sea, taken from the depths up to 2080 meters during the M84 / 2 expeditions of the University of Bremen on the research vessel "METEOR" (stations 233, 242, 258, 269) and on the research vessel "MARE NIGRUM" Romania (station 116) [2].

Isolated strains were previously identified by defining the spectrum of fatty acids on a BioRad gas chromatograph using the standard method [4] using an automatic identification system of MIDI Sherlock microorganisms based on a gas chromatograph with Agilent 7890 flame ionization detector (Agilent Technologies, USA).

Screening of antagonists was carried out using the radial streaks method on the Hauze-2 medium [1]. As indicators for pre-screening there were used the strains *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* B-329, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Bacillus subtilis* ATCC 10774.

For to the provided indicator strains, grateful thanks to the Head of the Department of physiology and taxonomy of micromycetes, Kurchenko I. M., and the head of the department of antibiotics in IMV NASU Avdeeva L. V.

Results and discussion

Among 250 tested strains, 79 were antagonistic, representing about 32%. It can be seen from the table that the most active studied strains were against *Candida albicans* ATCC 10231 (average growth inhibition zones 21.52 mm), *Proteus vulgaris* ATCC 6896 (average growth inhibition zones 19.88 mm), and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (the average size of growth inhibition zones is 16.03 mm). The least-susceptible were *Pseudomonas aeruginosa* B-329 (average size of growth inhibition zones – 6.65 mm), *Escherichia coli* ATCC 25922 (average



growth inhibition zone 8.05 mm), and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 (average size of inhibition zones growth – 8.25 mm) (Table).

Table

Antimicrobial activity of endosporeforming bacteria isolated from deep water sediments of the Black sea

Species	Strain, station, horizon	1*	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>B. licheniformis</i>	055 (233, 0-5)	3,0	4,0	4,0	5,0	0,0	2,0	3,0	3,0	3,0
<i>B. megaterium</i>	955 (233, 0-5)	24,0	0,0	34,0	7,0	29,0	0,0	6,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	219 (233, 5-10)	24,0	0,0	32,0	13,5	27,0	5,0	6,5	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	211 (233, 5-10)	32,5	0,0	35,0	17,0	35,0	6,0	17,5	8,5	0,0
<i>B. subtilis</i>	203 (233, 5-10)	29,0	0,0	35,0	13,5	25,0	8,0	13,0	8,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	204 (233, 5-10)	32,0	0,0	35,0	15,0	30,0	11,0	11,5	2,0	2,5
<i>B. atrophaeus</i>	200 (233, 5-10)	35,0	2,5	35,0	19,0	35,0	7,0	21,0	9,0	0,0
<i>B. cereus</i>	213 (233, 5-10)	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	212 (233, 5-10)	32,0	0,0	35,0	14,5	35,0	7,5	15,0	4,0	0,0
<i>B. atrophaeus</i>	010 (233, 10-15)	5,0	3,5	4,0	10,0	5,0	5,0	2,5	1,0	0,0
<i>B. licheniformis</i>	043 (233, 15-20)	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. licheniformis</i>	014 (233, 15-20)	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. pumilus</i>	002 (233, 15-20)	0,0	0,0	8,0	6,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. pumilus</i>	004 (233, 15-20)	3,5	3,5	5,0	9,5	0,0	4,0	3,0	2,0	2,0
<i>B. megaterium</i>	003 (233, 15-20)	0,0	0,0	7,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
<i>B. licheniformis</i>	012 (233, 15-20)	0,0	0,0	6,5	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. licheniformis</i>	99B (233, 20-25)	0,0	0,0	2,5	10,5	5,0	0,0	0,0	0,0	6,5
<i>B. atrophaeus</i>	99A (233, 20-25)	3,5	0,0	0,0	14,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0
<i>B. licheniformis</i>	005 (233, 25-30)	0,0	0,0	10,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. licheniformis</i>	001 (233, 30-35)	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	920 (233, 0-5)	-**	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	-	9,0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	921 (233, 0-5)	-	11,0	10,0	-	11,0	11,0	-	-	12,0
<i>B. pumilus</i>	99A (258, 0-5)	35,0	0,0	35,0	14,0	35,0	5,0	18,5	10,0	0,0
<i>B. pumilus</i>	232(258, 5-10)	0,0	0,0	5,0	3,5	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>P. larvae</i>	018 (258, 5-10)	25,5	0,0	30,0	15,5	26,5	4,0	7,5	8,5	5,0
-	019 (258, 5-10)	5,5	0,0	0,0	14,5	0,0	3,5	0,0	0,0	6,5
<i>B. subtilis</i>	231 (258, 5-10)	35,0	5,0	35,0	16,0	28,0	7,5	18,0	9,0	8,0
<i>B. subtilis</i>	217 (258, 5-10)	27,5	3,0	35,0	16,5	35,0	9,0	10,0	7,5	0,0
<i>B. subtilis</i>	247 (258, 10-15)	19,5	2,0	28,0	15,0	22,0	9,5	10,5	10,0	0,0
<i>B. atrophaeus</i>	246 (258, 10-15)	0,0	0,0	3,5	6,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	021 (258, 10-15)	6,0	3,0	11,0	20,0	35,0	12,5	12,5	14,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	239 (258, 30-35)	30,0	0,0	35,0	14,5	30,0	7,0	17,0	13,0	0,0
<i>B. megaterium</i>	035 (258, 30-35)	34,0	0,0	35,0	20,0	35,0	13,0	21,5	15,0	0,0



Table continued

<i>B. megaterium</i>	069 (242, 0-5)	0,0	0,0	1,5	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>P. macerans</i>	953 (242,0-5)	-	9,0	15,5	-	16,5	15,5	-	-	7,0
<i>Br. reuszeri</i>	031 (242, 0-5)	2,0	0,0	4,0	19,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. megaterium</i>	957(242,0-5)	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	-	9,0
<i>B. megaterium</i>	067 (242, 0-5)	4,5	0,0	1,5	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	959(242,0-5)	-	0,0	10,0	-	0,0	8,0	-	-	0,0
<i>B. pumilus</i>	229 (242, 0-5)	21,5	0,0	32,5	5,0	21,5	0,0	0,0	5,0	0,0
<i>B. agaradhaerens</i>	960(242,0-5)	-	14,0	13,5	-	13,5	15,5	-	-	7,0
<i>B. subtilis</i>	923 (242, 0-5)	30,0	2,5	35,0	13,5	35,0	5,5	9,0	3,5	0,0
<i>B. subtilis</i>	961(242,0-5)	-	0,0	9,0	-	0,0	0,0	-	-	0,0
<i>B. subtilis</i>	967(242,0-5)	-	0,0	6,0	-	0,0	5,5	-	-	0,0
<i>B. subtilis</i>	968(242,0-5)	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	-	13,0
<i>B. megaterium</i>	032 (242, 0-5)	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	970(242,0-5)	-	11,0	13,0	-	0,0	12,0	-	-	0,0
<i>B. megaterium</i>	980(242,0-5)	-	7,0	7,5	-	0,0	0,0	-	-	0,0
<i>B. licheniformis</i>	986(242,0-5)	-	0,0	0,0	-	0,0	10	-	-	0,0
<i>B. pumilus</i>	989(242,0-5)	-	9,0	0,0	-	0,0	0,0	-	-	0,0
<i>B. subtilis</i>	001 (242, 5-10)	35,0	0,0	16,0	12,5	35,0	2,0	3,0	13,0	3,5
<i>B. subtilis</i>	013 (242,10-15)	35,0	0,0	35,0	16,0	35,0	3,5	17,0	8,0	0,0
<i>B. pumilus</i>	041 (242, 10-15)	7,0	0,0	20,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. atrophaeus</i>	008 (242, 10-15)	0,5	3,0	1,5	5,0	0,0	1,5	1,0	0,0	2,0
<i>B. megaterium</i>	040 (242, 10-15)	35,0	0,0	16,0	7,5	27,0	3,0	4,5	11,0	0,0
<i>B. licheniformis</i>	249 (242, 15-20)	0,0	0,0	0,0	7,5	2,5	1,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	251 (242, 15-20)	0,5	1,5	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5
<i>B. subtilis</i>	248 (242, 15-20)	0,0	2,0	6,0	6,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
<i>B. licheniformis</i>	245 (242, 25-30)	0,0	0,0	7,5	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	033 (242, 25-30)	0,0	1,5	1,5	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. pumilus</i>	932 (269, 0-05)	-	5,0	5,0	-	0,0	13,0	-	-	5,0
<i>B. megaterium</i>	063 (269, 0-05)	12,0	0,0	23,5	0,0	13,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. pumilus</i>	049 (269, 45-50)	1,5	0,0	17,5	10,5	35,0	2,0	4,5	10,0	0,0
<i>B. megaterium</i>	051 (269, 45-50)	9,0	0,0	20,5	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	053 (269, 45-50)	35,0	0,0	35,0	19,0	35,0	12,5	19,5	8,0	0,0
<i>B. megaterium</i>	054 (269, 45-50)	28,0	0,0	35,0	15,0	29,5	3,5	16,5	14,0	0,0
<i>B. licheniformis</i>	048 (269, 45-50)	18,0	0,0	22,5	6,5	27,5	2,0	8,0	8,0	0,0
<i>B. atrophaeus</i>	993 (249, 0-16)	-	15,0	16,0	-	15,0	0,0	-	-	14,0
<i>B. subtilis</i>	997 (249, 0-16)	-	0,0	27,0	-	15,0	10,0	-	-	28,0
<i>B. subtilis</i>	941 (116, 0-02)	-	9,0	15,0	-	13,0	12,0	-	-	13,0
<i>B. subtilis</i>	943(116, 0-02)	-	15,0	11,0	-	18,0	14,0	-	-	13,0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	946(116, 0-02)	-	7,5	7,5	-	8,5	14,0	-	-	19,5



Table continued

<i>B. subtilis</i>	902 (116, 0-05)	-	0,0	6,0	-	13,0	11,0	-	-	12,5
<i>B. subtilis</i>	903 (116, 0-05)	-	5,5	5,5	-	11,5	0,0	-	-	7,0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	905 (116, 0-05)	-	7,5	15,0	-	6,5	13,0	-	-	14,0
<i>B. agaradhaerens</i>	906 (116, 0-05)	-	7,5	13,5	-	6,5	15,5	-	-	14,0
<i>B. subtilis</i>	907 (116, 0-05)	-	6,5	7,0	-	7,0	11,5	-	-	12,5
<i>B. amyloliquefaciens</i>	908 (116, 0-05)	-	7,0	8,0	-	11,5	15,5	-	-	8,5
<i>B. subtilis</i>	909 (116, 0-05)	-	16,0	14,0	-	16,0	-	-	-	14,0
Average***		19,88	6,65	16,03	11,28	21,51	8,05	11,01	8,20	9,10
Portion of active strains (%)		68	38	89	85	57	60	51	47	39

Note: *– 1. *Proteus vulgaris* ATCC 6896, 2. *Pseudomonas aeruginosa* B-329, 3. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, 4. *Bacillus cereus* ATCC 14579, 5. *Candida albicans* ATCC 10231, 6. *Escherichia coli* ATCC 25922, 7. *Salmonella enterica* NCTC 6017, 8. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, 9. *Bacillus subtilis* ATCC 10774;

** – Was not determined;

*** Average values of growth absence zones in millimeters without zero ones.

A high degree of antagonism is shown for gram-positive bacteria *S. aureus* and *B. cereus* (the portion of bacteria active against to them reached 89% and 85%, respectively, among all active strains). Antagonism to enterobacteria (*Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) was 68, 60 and 51%, respectively. At the lowest level, there was antagonistic activity in relation to *Pseudomonas aeruginosa*. A characteristic feature is the significant difference between the average antagonistic activity of the museum strains in relation to the indicator strains *B. cereus* and *B. subtilis*.

The highest activity among all identified species was detected in *P. larvae*, *P. macerans* and *B. atrophaeus* with a corresponding index of 86%. Significant activity was noted also for species known from the literature as the producers of bacteriocins and antibiotics – *B. subtilis* with a 60% and *B. licheniformis* – 58%, *B. amyloliquefaciens* – 57%. It is interesting, that the strains of the species *B. agaradhaerens* (66%), for which there is no known ability to synthesize antibiotics or bacteriocins, have been shown to be very close. The lowest activity was observed for the strains of *B. megaterium* (26%), *B. pumilus* (19%), *B. cereus* (17%) and *Br. reuszeri* (6%).

The antimicrobial activity of the investigated strains unlinearly depended on the depth of the horizon from which they were obtained. This dependence can be described as the gradual increase in the proportion of antagonistic active strains from the surface to a depth of about 15 cm, followed by gradual decrease to 40% on the horizon of 25–30 cm (Figure).

The known average rate of accumulation of bottom sediments in the Black sea, which is approximately 10 mm in 20 years [9], can help to interpret this information from paleoclimatic point of view as reflection of changes in precipitation dynamics in this region during the last millenium.



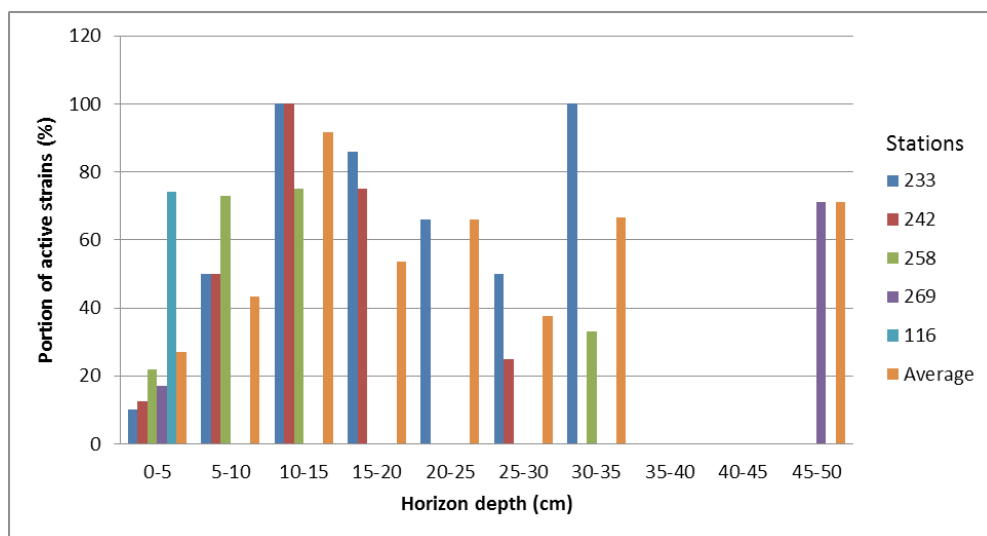


Fig. Dependence of portion of antagonistically active strains (in percentages) on the horizon depths

Thus, the obtained data indicate the perspectiveness of naturally preserved marine bacteria in the bottom sediments of the Black sea for the search for the producers of new antimicrobial drugs against opportunistic human pathogens.

Н. Д. Штеников, А. Н. Остапчук, В. А. Иваныця

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
Ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
e-mail: shtenikovnik@gmail.com

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ГЛУБОКОВОДНЫХ ДОННЫХ ОСАДКОВ ЧЕРНОГО МОРЯ

Реферат

Цель. Целью работы было изучить антагонистическую активность штаммов факультативно-анаэробных спороутворювальних бактерий, выделенных из глубоководных отложений Черного моря. **Методы.** В работе использованы 250 штаммов факультативно-анаэробных спороутворювальних бактерий, выделенных из проб глубоководных отложений Черного моря. Антагонистическую активность определяли по методу радиальных штрихов. Как индикаторы для скрининга использовали штаммы оппортунистических патогенов человека – *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* B-329, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Bacillus subtilis* ATCC 10774. **Результаты.** Выявлено, что 32% всех изолированных черноморских штаммов факультативно-анаэробных спорообразующих бактерий демон-



стрируют антагонистическую активность разной степени выраженности по отношению к условно-патогенным микроорганизмам. Отмечена определенная зависимость между видовой принадлежностью штамма, горизонтом его происхождения и антагонистической активностью. **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о перспективности штаммов спорообразующих бактерий донных отложений Черного моря для скрининга продуцентов антимикробных соединений с активностью, направленной против оппортунистических патогенов человека.

Ключевые слова: спорообразующие бактерии, антимикробная активность, Черное море.

References

1. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках – М.: Высшая школа, 1986. – 448 с.
2. Іваниця В. О., Штеніков М. Д., Остапчук А. М. Факультативно-анаэробні спороутворювальні бактерії глибоководних відкладень Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 4). – С. 28–36.
3. Abriouel H., Franz C.M., Ben Omar N., Gálvez A. Diversity and applications of Bacillus bacteriocins // FEMS Microbiology Rev. – 2011. – 35, N 1. – P. 201–232.
4. Costa, da M. S., Albuquerque L., Nobre F. M., Wait R. The Identification of Fatty Acids in Bacteria // Methods in Microbiology. – 2011. – V. 38, N 1. – P. 183–196.
5. Fajardo-Cavazos P., Maughan H., Nicholson W. L. Evolution in the Bacillaceae // Microbiol. Spectrum. – 2014. – V. 2, N 5. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104365>
6. Mandic-Mulec I., Stefanic P., Elsas van J. D. Ecology of Bacillaceae. // Microbiology Spectrum. – 2015. – V. 3, N 1. – P. 1–24.
7. Pérez-Gutiérrez R.-A., López-Ramírez V., Islas A., Alcaraz L. D., Hernández-González I. Antagonism influences assembly of a Bacillus guild in a local community and is depicted as a food-chain network // The ISME Journal. – 2013. – V. 7, N 3. – P. 487–497.
8. Prieto M. L., O'Sullivan L., Tan S. P., McLoughlin P., Hughes H., O'Connor P. M., Cotter P. D., Lawlor P. G., Gardiner G. E. Assessment of the Bacteriocinogenic Potential of Marine Bacteria Reveals Lichenicidin Production by Seaweed-Derived Bacillus spp. // Mar. Drugs. – 2012. – V.10, N 10. – P. 2280–2299.
9. Smith L.D.S., Cato E. Clostridium durum, sp. nov., the predominant organism in a sediment core from the Black Sea // Canadian Journal of Microbiology. – 1974. – V. 20, N 10. – P. 1393–1397.
10. Zaitsev Y. P., Alexandrov B. G. Black Sea Biological Diversity. – New York, United Nations Publications, 1998. – 362 p.

References

1. Егоров NS Osnovy ucheniya ob antibiotikah – М.: Vysshaya shkola, 1986. – 448 s.
2. Ivanitsia VO, Shtenikov MD, Ostapchuk AM. Fakultatyvno-anaerobni



sporoutvoriuvalni bakterii hlybokovodnykh vidkladen chornoho moria. Mikrobiologiya i biotekhnologiya. 2015;32(4):28-36.

3. Abriouel H, Franz CM, Ben Omar N, Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiology Rev. 2011;35(1):201-232.

4. Costa da M.S, Albuquerque L, Nobre FM, Wait R. The Identification of Fatty Acids in Bacteria. Methods in Microbiology. 2011;38(1):183-196.

5. Fajardo-Cavazos P, Maughan H, Nicholson W.L. Evolution in the Bacillaceae // Microbiol. Spectrum. – 2014. – V. 2, N 5. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104365>

6. Mandic-Mulec I, Stefanic P, Elsas van JD. Ecology of Bacillaceae. Microbiology Spectrum. 2015;3(1):1-24.

7. Pérez-Gutiérrez RA., López-Ramírez V, Islas A, Alcaraz LD, Hernández-González I Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. The ISME Journal. 2013;7(3):487-497.

8. Prieto ML, O'Sullivan L, Tan SP, McLoughlin P, Hughes H, O'Connor PM, Cotter PD, Lawlor PG, Gardiner GE. Assessment of the Bacteriocinogenic Potential of Marine Bacteria Reveals Lichenicidin Production by Seaweed-Derived *Bacillus* spp. Mar. Drugs. 2012;10(10):2280-2299.

9. Smith LDS, Cato E. *Clostridium durum*, sp. nov., the predominant organism in a sediment core from the Black Sea. Canadian Journal of Microbiology. 1974;20(10)1393-1397.

10. Zaitsev YP, Alexandrov BG. Black Sea Biological Diversity. New York, United Nations Publications, 1998. 362 p.

Стаття надійшла до редакції 31.08.2018 р.



ЮВІЛЕЇ І ДАТИ

АКАДЕМІК СЕРГІЙ ВАСИЛЬОВИЧ КОМІСАРЕНКО – ЗАСНОВНИК МОЛЕКУЛЯРНОЇ ІМУНОЛОГІЇ В УКРАЇНІ, ВІДОМИЙ ДЕРЖАВНИЙ І ГРОМАДСЬКИЙ ДІЯЧ (До 75-річчя від дня народження)

Академік НАН України професор С. О. Костерін,
канд. біол. наук В. М. Данилова
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
valdan@biochem.kiev.ua



С. В. Комісаренко

ученим моделювати і вивчати на різних рівнях організації (молекулярному, субклітинному, клітинному і міжклітинному, а також органному) загальні біологічні процеси, пов'язані з диференціацією, проліферацією та смертю клітин, з механізмами між- і внутрішньоклітинної сигналізації, зрештою вивчати структурну організацію та функціонування макромолекул у лімфоцитах. Імунохімічні методи дослідження є основою для створення і використання високочутливих та високоспецифічних імунодіагностиків, що конче необхідні для медицини, ветеринарії та промисловості, зокрема для розвитку імунобіотехнологій чи моніторингу стану довкілля.

Саме цією найскладнішою, найцікавішою та вкрай важливою наукою й зацікавився Сергій Васильович Комісаренко, першим в Україні започаткувавши науковий напрям досліджень – молекулярну імунологію.



Все починається с дитинства. Сергій Васильович Комісаренко народився 9 липня 1943 р. в м. Уфа (Російська Федерація), куди на час війни були евакуйовані установи АН УРСР.



**Батьки Сергія В. Комісаренка.
Київ, 1983**

ни, навчали мовам, музиці, гарним манерам. У спогадах Сергій Васильович відзначає: *«Нас з братом батьки виховували, я б сказав, раціонально – в міру суворо, в міру ліберально. Мали все, що необхідно, особливо для освіти, але нічого зайвого, навіть натяку на розкіш».*

У 1951–1960 рр. Сергій навчався в одній із кращих київських шкіл – 92-й імені Івана Франка (колишня колегія Павла Галагана на вул. Б. Хмельницького, 9). Це була перша українсько-англійська школа в Києві з поглибленим вивченням англійської мови. По закінченні середньої школи Сергій – відмінник із чудовим знанням англійської мови, вступив на лікувальний факультет Київського медичного інституту (нині Національний медичний університет імені О. О. Богомольця).

Ще в старших класах Сергія зацікавили механізми життєдіяльності людини та взагалі живих істот, і тому він вагався перед вибором – медінститут чи біофак університету. Батько пояснив, що тільки медична освіта дає глибокі знання про найвище і найскладніше творіння – людину, і що саме ці знання дозволяють краще розуміти закономірності функціонування інших живих організмів.

Студентські роки. Роки, проведені в медичному інституті (1960–1966), були насичені не тільки навчанням. Життєвим девізом С. Комісаренка стало тоді й залишається дотепер – **не витратити марно бодай хвилину свого життя**. На перших курсах він активно займався спортом; на третьому курсі, щоб хоч трохи опанувати «практичну медицину», рік працював ночами на міській станції швидкої допомоги фельдшером (1963–1964). Навчаючись на

Батько – *Василь Павлович Комісаренко* (1907–1993) – видатний український вчений, патофізіолог-ендокринолог, засновник Київського науково-дослідного інституту ендокринології та обміну речовин МОЗ УРСР (1965), який зараз носить його ім'я. Мати – *Любов Іларіонівна Дросовська-Комісаренко* (1908–1994), економіст за освітою, старший науковий співробітник Інституту економіки НАН України, мала мудрість віддати перевагу не кар'єрним перспективам, а вихованню дітей та створенню в оселі умов, сприятливих для роботи чоловіка. Сім'я Комісаренків була шляхетною, з раннього дитинства дітям прищеплювали інтерес до знань та культурної спадщини.





С. Комісаренко – випускник медінституту. Київ, 1966

четвертому курсі, вступив на вечірнє відділення механіко-математичного факультету Київського державного університету імені Т.Г. Шевченка (1964–1967). Окрім того Сергій Комісаренко регулярно відвідував і працював у біохімічному гуртку.

В медінституті того часу викладало багато талановитих педагогів – як лекторів, так і тих, хто вів практичні заняття, але Сергій вчився не тільки на кращих прикладах, а й на таких, як «не треба робити». Крім того, він тяжів до лекцій на сучасні та, як на той час, провокуючі теми і тому не оминав публічні виступи таких видатних особистостей, як, наприклад, *В. М. Глушков*, *М. М. Амосов*, *С. М. Гершензон* та інші.

Перші кроки в науці. 1966 рік... Позаду навчання, попереду – вибір життєвого шляху. Після закінчення медінституту з відзнакою Сергій Комісаренко мав вибирати між практичною медициною і науковою діяльністю. І він обирає науковий шлях. Так, у 1966 р. він вступає до аспірантури Інституту біохімії АН УРСР у відділ біосинтезу та біологічних властивостей білка, де його науковим керівником став видатний вітчизняний біохімік, академік *М. Ф. Гулий*. В Інституті біохімії в той час взагалі працювало багато всесвітньо відомих вчених, і для молодих науковців 60-х років прекрасною школою була творча атмосфера, яка панувала в Інституті.



«Подяка учителю» – квіти академіку Гулому після захисту дисертації. Київ, 1970



Розуміючи важливість методичного рівня у дослідженнях, Сергій Комісаренко під час навчання в аспірантурі досконало засвоїв низку найсучасніших на той час біохімічних методів: *йонобмінну хроматографію, гель-фільтрацію, методи електрофорезу, очистки та кристалізації тканинних білків, ізотопні методи* тощо.

Кандидатську дисертацію на тему «*О роли цикла трикарбоновых кислот в биосинтезе белка у животных*» С. Комісаренко захистив 12 червня 1970 р. на Вченій раді Інституту біохімії. Ця дисертаційна робота присвячена важливому питанню – з'ясуванню ролі проміжних продуктів циклу трикарбонових кислот (циклу Кребса) у біосинтезі білка. *І це було новим словом в науці.*

Після закінчення аспірантури в 1969 р. Сергій Васильович працює у тому ж відділі біосинтезу та біологічних властивостей білка спочатку молодшим науковим співробітником, а з 1973 р. – старшим науковим співробітником. З березня 1972 р. до лютого 1974 р. С. В. Комісаренко був вченим секретарем Інституту біохімії імені О. В. Палладіна, поєднуючи велику організаційну роботу з науковою діяльністю.

У цей період Сергій Комісаренко для продовження наукової діяльності за порадою свого наукового керівника і вчителя М.Ф. Гулого обирає зовсім новий напрям досліджень – *біохімію імунітету*. З цього часу розпочинається наступний етап його наукової діяльності. Він зупиняється на двох проблемах: *можливості регуляції метаболізму клітини фосфонатами* – похідними неорганічного пірофосфату, які не гідролізуються, та на регуляції *біосинтезу антитіл*. Обидві проблеми були дуже цікавими, особливо біосинтез антитіл.

Сергія у той час хвилювало багато питань, які були фундаментальними для розуміння того, як функціонує імунна система, але відповідей – обмаль, можливо тому, що в Україні сучасною *фундаментальною імунологією* практично ніхто не займався. Не вистачало й спеціальної літератури з імунології. Тому Сергію Васильовичу довелося не тільки терміново займатися «імунохімічною» освітою та опановувати імунохімічні методи досліджень, передусім методи визначення взаємодії антиген–антитіло та виділення реагуючих партнерів імуносорбцією, але й створювати відповідну методичну базу, якої тоді не було ні в Інституті біохімії, ні в інших установах України.

Тут доречно згадати, що С. В. Комісаренко завжди приділяв першочергову увагу найсучаснішим методам дослідження і завдяки своїм організаційним здібностям та знанню англійської мови започаткував в Інституті біохімії низку регулярних семінарів провідних іноземних компаній, присвячених сучасним методам біохімії та клітинної біології, які відіграли вкрай важливу роль у методичній підготовці і в оснащенні установ, передусім АН УРСР, та й інших відомств, найновішим устаткуванням та реагентами. Спочатку це був чи не найперший в СРСР семінар шведської фірми *Pharmacia Fine Chemicals* – виробника сефадексів та сефароз для хроматографії, потім – *LKB* (Швеція), *Flow* (Велика Британія), *Dakopatts* (Данія), *Coulter Electronics* (США–Франція) тощо. За його ініціативою в Інституті біохімії було створено демонстраційну хроматографічну лабораторію *Amersham* (Велика Британія).

Та повернемося до імунохімії. Вирішальну роль у становленні Сергія Комісаренка як імунохіміка відіграло відрядження для наукової роботи до



лабораторії імуноцитохімії Пастерівського інституту в Парижі (1974–1975). На той час Інститут Пастера (і особливо його Відділення молекулярної біології) були серед провідних світових центрів біологічної науки.

Тут його вчителями стали: один із засновників імунохімії, академік Французької академії медицини *П'єр Грабар* (колишній киянин професор Петро Миколайович Грабар) та його учень,

першовідкривач «пероксидазних» методів професор *Стратіс Аврамеас*. Лабораторія імуноцитохімії Аврамеаса містилася в найсучаснішому на той час підрозділі Пастерівського інституту – у Відділенні молекулярної біології, яке по суті було окремим великим інститутом. Під час роботи в Інституті Пастера С. Комісаренко засвоював методи імунохімічного аналізу, а також імунологію та молекулярну біологію, розробляв проект майбутньої експериментальної роботи. Він опанував і застосував у науково-дослідній роботі низку сучасних імунохімічних методів, зокрема імуноензиматичних та імуноцитозиматичних; синтезував і вивчив властивості різних імуносорбентів. Особливу увагу він приділяв дослідженню біосинтезу імуноглобулінів. Так, імуноензиматичним методом ним було з'ясовано динаміку біосинтезу антитіл і неспецифічних імуноглобулінів у лімфоцитах *in vivo* та вивчено вплив метиленбісфосфонової кислоти на ці процеси і на стимуляцію конканаваліном А бласттрансформації лімфоцитів [1].

Вкрай важливим наслідком цього наукового стажування для себе Сергій Комісаренко вважає те, що за короткий час за рахунок інтенсивної роботи він став біохіміком-імунологом з молекулярно-біологічним мисленням та одним



Біля бюсту І. Мечникова в Пастерівському інституті. Париж, 1986 р.



В лабораторії імуноцитохімії Відділення молекулярної біології Інституту Пастера. Париж, 1974

із найерудованіших імунологів в СРСР. Свідченням цього було рішення віце-президента АН СРСР Ю. А. Овчинникова ввести молодого кандидата наук С. Комісаренка до складу престижної Ради з молекулярної біології АН СРСР. Він також запропонував йому очолити лабораторію імунології в Інституті біоорганічної хімії імені М. М. Шемякіна АН СРСР, але цю пропозицію Сергій Васильович відхилив.



До речі, на знак подяки Пастерівському інституту за здобуту «високу науку» перед його новим імунологічним корпусом імені Мечникова за ідеєю і клопотанням С.В. Комісаренка та певною мірою за його проектом у 1986 р. від імені Академії наук УРСР було встановлено пам'ятник І. І. Мечникову, нашому видатному землякові, роботи чудового українського скульптора Валентина Зноби.

Спочатку була лабораторія.

Через кілька місяців після повернення з відрядження, у вересні 1975 р., в Інституті біохімії було створено неструктурну лабораторію імунохімії, яка підпорядковувалася безпосередньо дирекції інституту і до складу якої спочатку увійшло 8 осіб на чолі з Сергієм Комісаренком. Тут він зосередився на більш-менш доступному – імунохімічному аналізі білків та на впровадженні методів імуноензиматичного аналізу, якими він оволодів у Пастерівському інституті. Більшість із них, особливо імунопероксидазні та електрофоретичні методи, пішли дуже успішно.

Корисним для майбутньої роботи виявилось стажування Сергія Комісаренка у 1981 р. в Нью-Йоркському протираковому центрі імені Слоан-Кеттерінга (США), де він вивчав *роль циклічних нуклеотидів і протеїнкіназ у проліферації лімфоцитів*, а також ознайомився з організацією імунологічних досліджень у цій країні.

За нетривалий час лабораторія імунохімії стала лідером у СРСР, зокрема щодо імунопероксидазного маркування антитіл та антигенів; її співробітники першими в СРСР розпочали імунохімічний аналіз пептидів та білків.

Звичайно, можливості лабораторії для імунологічних досліджень були обмежені через гостру нестачу устаткування, середовищ та якісних реагентів для культивування клітин, якісних ліній піддослідних тварин тощо. Та попри всі труднощі, завдяки зусиллям молодого керівника лабораторія розвивалася, зміцнювався кадровий склад, з'явилися власні аспіранти та дипломники. У 1979 р. в її складі було вже 15 співробітників та 4 аспіранти.

На початку 80-х стало очевидним, що лабораторія імунохімії в Інституті біохімії набула такого потенціалу, який дозволяв їй претендувати на статус наукового відділу: вона мала власну наукову тематику, забезпечену бюджетним та додатковим (через Держкомітет з науки і техніки СРСР) фінансуванням, потужний кадровий склад, енергійного і талановитого молодого керівника. Тому в 1982 р. С.В. Комісаренку вдалося переконати тодішнього директора Інституту академіка АН УРСР *В. К. Лішка* надати лабораторії імунохімії статус *відділу молекулярної імунології*.

Відділ молекулярної імунології на старті (80-ті роки). Головні наукові напрями досліджень у відділі залишалися, але інтереси і можливості розширювалися, у тому числі й завдяки поліпшенню матеріальної бази. Цьому, по-перше, сприяла співпраця зі шведськими фірмами *Pharmacia* та *LKB*, коли співробітники відділу організовували і безкоштовно перекладали їхні семінари в обмін на реактиви та дрібне устаткування. Однак Сергій Комісаренко





Відділ молекулярної імунології. Київ. ІБХ, 1982 р.

розумів, що цього недостатньо, і тому він за підтримки Президента АН УРСР академіка *Б. Є. Патона* порушив клопотання перед Головою ДКНТ СРСР *Г. І. Марчуком* про цільове виділення валюти для закупівлі устаткування для відділу молекулярної імунології.



Президент АН УРСР, академік Б. Патон у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії (зліва – направо: директор ІБХ В. Лішко, зав.відділом С. Комісаренко, Б. Патон, головний вчений секретар АН УРСР В. Тонкаль, віце-президент АН УРСР К. Ситник, заступник директора ІБХ В. Кокунін, віце-президент АН УРСР В. Скок). 1986

Саме це обладнання для культивування клітин, а також протоковий цитофлуориметр Coulter - EPICS C, що працював у відділі з 1984 року (придбаний коштом резерву Ради Міністрів УРСР), стали основою матеріально-технічної бази відділу на багато років, зокрема для одержання гібридом – продуцентів моноклональних антитіл [2].

З огляду на те, що вивчення структурних генів, що кодують структуру імуноглобулінів, у Києві було неможливим (хоча невдалі спроби були), кілька років поспіль головними науковими напрямками досліджень лабораторії, а



згодом і відділу були: *вивчення механізмів імунотропної і протипухлинної дії фосфорорганічних похідних неорганічного пірофосфату та розроблення і використання методів імунохімічного аналізу протеїнів для подальшого визначення механізмів молекулярного розпізнавання антигенів імунною системою організму.*

Бісфосфонати та фосфонати – структурні аналоги відповідно неорганічного пірофосфату (PPi) та фосфату – було вибрано для дослідження апріорі, виходячи з того, що PPi як продукт або субстрат задіяний у великій кількості найважливіших ензиматичних реакцій. Дослідження імунотропної дії бісфосфонатів, що проводилися вченими відділу під керівництвом Сергія Комісаренка, *були чи не найпершими в світі.*

Було встановлено імуномодуляторну активність *метиленбісфосфонової кислоти (МБФК)* і показано, що основою її імуномодуляторної дії є тропізм до лімфоцитів. Важливим виявився і відкритий ними протипухлинний ефект МБФК, який потребував аналізу, а потім і відповідних доклінічних досліджень.

Результати цих наукових досліджень стали основою докторської дисертації Сергія Васильовича Комісаренка «*Биологическое действие бисфосфонатов и регуляция иммунного ответа*», яку він захистив у 1989 р. на засіданні вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики АН УРСР за двома спеціальностями: «молекулярна біологія» та «біохімія».

Внаслідок цих фундаментальних досліджень у відділі під його керівництвом на основі бісфосфонатів було створено декілька прототипів медичних препаратів. Так, було синтезовано *поліуретанову композицію*, яка діяла як іммобілізований *імуномодулятор із місцевим протизапальним та імуносупресорним ефектом*. Доведено протипухлинну активність динатрієвої солі метиленбісфосфонової кислоти і запропоновано новий *протипухлинний препарат* «МЕБІФОН», який успішно пройшов всі клінічні випробування і зараз випускається ПАО «Фармак» (Київ). МЕБІФОН – інноваційний вітчизняний лікувальний препарат з протипухлинною та імуномодулювальною дією, що використовується для боротьби з пухлинами грудної залози у жінок та передміхурової залози у чоловіків. Особливо важливим є використання «МЕБІФОНУ» для боротьби з метастазами пухлин у кістки [3].

Під керівництвом Сергія Васильовича було також створено імуновекторні молекули – *імунотоксини* для вибіркового руйнування клітин-мішеней. Ефективність специфічних імунотоксинів у культурі пухлинних клітин виявилася у 25 разів вищою за «чистий» токсин [4].

Водночас у відділі молекулярної імунології проводили дослідження *імунохімічної структури протеїнів і пептидів*, які почалися з аналізу нейротоксину *апаміну* – одного з компонентів бджолиної отрути та *цитохрому с*. Ці фундаментальні дослідження під керівництвом Сергія Комісаренка з аналізу *апаміну та цитохрому с* були першими в СРСР роботами з імунохімічного дослідження протеїнів і пептидів. На основі даних імунохімічного аналізу цитохрому с та динаміки формування антитіл проти цього протеїну С. Комісаренко висунув декілька цікавих гіпотез [5].

З огляду на те, що *цитохром с* виходить із мітохондрій за ішемії, ло-



гічним було припустити, що він з'являється в кровотоці, зокрема за інфаркту міокарда, і може стимулювати утворення специфічних антитіл, які, в свою чергу, впливатимуть на його перебіг. В зв'язку з цим у відділі молекулярної імунології під керівництвом Сергія Комісаренка було розроблено *метод визначення цитохрому с і специфічних до нього антитіл в крові людей*. Метод було успішно апробовано в Інституті кардіології імені М. Д. Стражеска для діагностики ускладненого перебігу інфаркту міокарда. На цей метод одержано авторське свідоцтво [6].

На жаль, ці роботи з імунохімічного аналізу цитохрому с було призупинено із багатьох причин, передусім через порушення наукових зв'язків із Росією на початку 90-х років і відсутність відповідних пептидів.

Окрім того, на основі імунохімічного аналізу *нейроспецифічних протеїнів S-100 та 14-3-2* у відділі було створено метод визначення їх у лікворі та крові хворих із пухлинами та травмами головного мозку, що має значення для діагностики цих захворювань.

Впровадження гібридної техніки одержання моноклональних антитіл. Використання сучасних методів молекулярної і клітинної імунології, у тому числі *протокової цитофлуориметрії* (у відділі був єдиний в СРСР активно функціонуючий цитофлуориметр), надало можливість науковцям відділу під керівництвом С. В. Комісаренка не тільки проводити кількісний аналіз антигенів, локалізувати антигени й антитіла на поверхні клітин та у внутрішньоклітинних структурах, але й виділяти окремі клітини для подальшого аналізу їх та клонування. Проте стало очевидним, що дослідження імунологічних явищ, так само як і одержання моноклональних антитіл, є практично неможливим без культури клітин.

І знову Сергій Васильович виявив ініціативу. Він одним із перших в СРСР ввів у дослідження гібридну техніку одержання моноклональних антитіл (мкАТ). Широке впровадження цього методу (тепер зовсім тривіального) стало можливим після закупівлі відповідного лабораторного обладнання, а також культуральних середовищ.

З цією метою у відділі було створено так звану «гібридну» групу під керівництвом канд.біол. наук *І. М. Колеснікової*, яка одержала велику кількість клонів гібридом – *продуцентів мкАТ*. Серед антитіл із багатим спектром специфічності виділено та проаналізовано декілька антитіл з унікальними властивостями: проти окремих ланцюгів *інсуліну людини, пероксидази, одержаної із хрому, цитохрому с коня, нейроспецифічних протеїнів*, проти унікальної антигенної детермінанти очищеного протеїнового деривату *туберкуліну мікобактерій* великої рогатої худоби, проти різних епітопів молекул *плазміногену, фібриногену і/або фібрину* та їхніх фрагментів тощо. Останні антитіла є надзвичайно важливими для вивчення антигенної структури протеїнів і механізмів зсідання крові та фібринолізу. Наведені вище дослідження заклали також основу для *імунобіотехнологічних методів* зі створення *імунодіагностичних та імунолікувальних препаратів*.

Чорнобильська аварія. Дуже важливі дослідження імунної системи було проведено Сергієм Васильовичем у відділі молекулярної імунології після аварії на Чорнобильській АЕС.



Використовуючи найсучасніші методи дослідження, вже наприкінці 1986 р., всупереч офіційній у ті роки концепції, Сергій Васильович із колегами вперше довів, що невеликі дози сумарної радіації (25 бер) істотно пригнічують систему природного імунітету, зокрема знижують кількість та активність природних клітин-кілерів, які відповідають за протипухлинний та противірусний імунітет [7]. Існування радіаційного імунодефіциту Сергій Комісаренко досить влучно назвав тоді «**чорнобильським СНІДом**». Ці дані спричинили бурхливу негативну реакцію керівництва МОЗ СРСР та УРСР, яка продовжувалася аж до 1991 року.

Стандартне на той час ствердження опонентів стосовно того, що встановлене в «ліквідаторів» пригнічення імунітету є наслідком дії не радіації, а стресу, було спростовано аналогічними результатами повторного вивчення імунної системи «ліквідаторів» через рік, коли в них вже не було ніякого стресу, та дослідженням інфраструктури різних субпопуляцій імунокомпетентних клітин, виділених сортуванням на цитофлуориметрі (спільно з лабораторією проф. К. П. Зака. Частина цих результатів увійшла в монографію під редакцією С.В. Комісаренка та К.П. Зака «*Радиация и иммунитет человека*», яка вийшла друком у 1994 р.

Життя підтвердило правомірність та своєчасність проведеної роботи, яка стала першим і об'єктивним дослідженням імунної системи людей, опромієних під час аварії на ЧАЕС. Проте у подальшій оцінці досліджень, пов'язаних із медичними наслідками чорнобильської трагедії, роботи С.В. Комісаренка з колегами практично не згадувалися, а різні нагороди отримували ті, хто у 1986–1991 рр. категорично заперечував негативні наслідки Чорнобильської катастрофи, що було досить типовим для тогочасної нашої країни. Щоправда, у 1997 р. Вчена Рада Кінгстонського університету у Великій Британії обрала С. В. Комісаренка *почесним доктором* свого університету за роботи з екології, присвячені дослідженню Чорнобильської катастрофи.



**Після вручення диплома Почесного доктора Кінгстонського університету:
разом з ректором університету сером Франком Лемплом.
Барбікан, Лондон, 1997**



Відділ молекулярної імунології у розвитку (від молекул до людини).
Усередині 80-х років у відділі молекулярної імунології сформувалося декілька груп, які працювали над *різними об'єктами і які були об'єднані між собою ідеями* Сергія Васильовича. Вважаємо доцільним коротко зупинитися на деяких результатах досліджень цих груп.

Імунохімічний аналіз протеїнів системи зсідання крові. Ще у 1975 р., після повернення із відрядження до Франції, С. В. Комісаренко запропонував акад. АН УРСР *В. О. Бєлицеру*, який тоді очолював *відділ структури і функції білка*, разом провести імунохімічне дослідження системи *фібриноген – фібрин*. Ідея Сергія Васильовича полягала у застосуванні спочатку моноспецифічних, а потім і мкАТ як молекулярних зондів для дослідження структури *фібрин(оген)у*, пошуку *неоантигенних детермінант*, що експонуються в процесі перетворення *фібриногену* на *фібрин*, виявлення *невдомих центрів полімеризації фібрину* та вивчення молекулярних механізмів цього процесу. Володимир Олександрович дуже зацікавився цією роботою, але з організаційних причин вона не розпочиналася аж до того часу, коли у 1985 р. до відділу молекулярної імунології з відділу структури і функції білка не перейшов канд. біол. наук, ст. наук. співр. *Е. В. Луговської* (нині – чл.- кор. НАН України, д-р біол. наук, проф., завідувач відділу структури і функції білка) разом зі своєю групою і до виконання цієї теми не долучилася «гібридна» група, про яку згадувалося вище.

Об'єднаною групою дослідників під керівництвом С. В. Комісаренка і Е. В. Луговської було одержано низку власних мкАТ до виділених *фібриногену, фібрину* на різних стадіях полімеризації та до *їхніх фрагментів*. Ці антитіла дозволили виявити нові раніше невідомі сайти на молекулі *фібрину*, що беруть участь у його полімеризації, та запропонувати певні механізми полімеризації фібрину.

Одержані результати мають *фундаментальне значення для уявлення про тонкі механізми формування тривимірної сітки фібрину*, яка створює каркас тромбу. За цю роботу С. В. Комісаренку зі співробітниками у 2003 р. було присуджено *премію імені О. В. Палладіна НАН України*. Вони також увійшли до монографії: *Э. В. Луговской, Е. М. Макогоненко, С. В. Комисаренко «Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина»*. Киев: Наукова думка. 2013, 230 с.

Синтез і використання мкАТ для теоретичних досліджень молекулярних механізмів тромбоутворення одночасно дозволило знайти і в подальшому використати ті з них, що з високою специфічністю та афінністю реагували *із фібриногеном, розчинним фібрином або димером D фрагменту фібриногена (D-димером)*, з метою розробки **імуноензимних тест-систем** для визначення зазначених молекулярних маркерів у плазмі крові людини. Результати цих досліджень захищено патентами [8–10].

Слід зазначити, що *за дослідження системи гемостазу людини та створення вітчизняних діагностикумів*, зокрема за допомогою власно одержаних мкАТ під керівництвом С. В. Комісаренка і Е. В. Луговської, в 2015 році, групу науковців Інституту було відзначено ***Державною премією України в галузі науки і техніки***.





**Чл.- кор. НАН України, проф. Е. Луговської, акад. НАН і НАМН України,
проф. С. Комісаренко, д-р біол. наук, проф. Є. Макогоненко. Київ, 2013**

Молекулярні механізми активації лімфоцитів. Ще із середини 70-х років Сергій Васильович вважав, що з'ясування молекулярних механізмів активації лімфоцитів (сигналіngu в лімфоцитах) є одним із найважливіших у молекулярній імунології, оскільки природа і механізм передачі сигналів від плазматичної мембрани імунокомпетентної клітини до її ядра на той час були невідомі. Самостійно в Києві ці питання підняти було неможливо. Під час стажування у 1981 році у протираковому центрі імені Слоан-Кеттерінга у Нью-Йорку в лабораторії Дж. Хеддена, який разом з Р. Коффі був відомий своїми роботами з вивчення ролі cGMP в активації лімфоцитів, Сергій Васильович розпочав цитофлуориметричне дослідження активації лімфоцитів з використанням диференційного забарвлення РНК та ДНК клітин акридиновим оранжевим, що дозволяло оцінювати проходження лімфоцитами фаз клітинного циклу та вплив йонів кальцію на активацію клітин.

Продовження робіт з урахуванням наявних методичних можливостей відбулося вже в Києві у відділі молекулярної імунології у 80-ті роки, а також пізніше групою дослідників (з 2012 р. – лабораторія імунології клітинних рецепторів) цього відділу під керівництвом учениці Сергія Васильовича М. В. Скок (нині – академік НАН України, д-р біол. наук, проф.), але вже з вивчення ролі нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChR) у лімфоцитах.

Відтоді об'єктом досліджень лабораторії є nAChR, які експресовані в центральній нервовій системі, в імунних клітинах та на внутрішньоклітинних органелах – мітохондріях, а також антитіла проти nAChR, як чинники впливу на nAChR за фізіологічних умов і як інструмент для дослідження.

Зокрема, досліджується роль антитіл проти $\alpha 7$ субтипу nAChR у розвитку нейрозапалення та нейродегенеративних патологій, подібних до хвороби Альцгеймера. Новим словом в науці стали й оригінальні дані, одержані в лабораторії, які відкрили новий холінергічний механізм регуляції мітохондріального шляху індукції апоптозу.

За ці роботи С. В. Комісаренко у співавторстві у 2012 р. одержав *премію імені І. І. Мечникова НАН України*.





Вручення премії імені І. І. Мечникова Президентом НАН України академіком Б. Є. Патонем. Київ, 2012

Наукові інтереси ще однієї групи (нині – лабораторії імунобіології) на чолі з іншим учнем Сергія Васильовича – Д. В. Колибою (нині – д-р біол. наук, проф.) зосереджено на вивченні *антигенної будови та імунобіологічних властивостей факторів патогенності та вірулентності збудників інфекційних захворювань* з метою вдосконалення методів їх діагностики та профілактики. Результатом цих досліджень стало створення *імунодіагностикумів* для аналізу *дифтерії* і *туберкульозу* [11–13].

Слід зазначити, що не тільки ці, але й інші фундаментальні дослідження Сергія Васильовича мали і мають практичну спрямованість. ***Наука – на користь людям – ще один життєвий девіз***, який сповідує Сергій Васильович. Мабуть, цьому сприяє його базова медична освіта і внутрішній покликання бути корисним суспільству.

Так, вже у 1979 р. за роботу зі створення якісних молочних продуктів харчування для немовлят (зокрема за імунохімічне дослідження протеїнів молока) йому було присуджено *Державну премію УРСР*. А дослідження біологічної дії бісфосфонатів та відкриття протипухлинного ефекту метиленбісфосфонової кислоти (МБФК) дозволило йому запропонувати лікарський препарат «Мєбіфон», про що йшлося вище. Вкрай перспективною є сучасна розробка зі створення новітнього комплексного препарату МБФК і вітаміну D3 - «МєБІВІД», що обіцяє бути чи не найефективнішими ліками проти *остеопорозу* [14].

Якщо додати до цього перспективу створення унікальних засобів для боротьби з *гемофіліями (кровотеча)*, стає зрозумілим, що фундаментальні дослідження науковців як відділу молекулярної імунології, так і Інституту в цілому, під керівництвом Сергія Васильовича мають продовження в медичних закладах і на полицях аптек.

На сьогодні він одноосібно або в співавторстві має досить вагомий науковий доробок, який налічує близько **500** друкованих праць, серед яких **9** монографій, понад **80** авторських свідоцтв і патентів.

Важливим є і науково-педагогічний бік його діяльності. Він читав



(читає) лекції у вітчизняних та зарубіжних університетах, виховав плеяду кваліфікованих фахівців, які сьогодні активно працюють у різних наукових та освітніх установах України, США, Німеччини тощо.

Як директор Інституту та академік-секретар Національної академії наук України С. В. Комісаренко всіляко підтримує наукову молодь. У нього є ще один **життєвий девіз: «Науку слід робити гуртом. Має бути єдність молодості й досвіду»**. Він вважає, і не безпідставно, що найбільш плідний вік для науковця в експериментальній біології є 30–50 років, коли люди роблять найзначніший внесок у наукову спадщину. Разом з тим дуже важливими є досвід, здобутки і традиції, набуті старшим поколінням науковців, які необхідно передавати молоді, що йде їм на зміну.



Вчитель і учні: молоді науковці відділу молекулярної імунології. Київ, 2013

У відділі наразі працює і навчається багато молодих науковців, які готові прийняти естафету від старшого покоління, засвоїти їхні наукові здобутки і йти далі до нових звершень. А ці наукові здобутки відділу молекулярної імунології досить вагомі й відомі не тільки в нашій країні, але й поза її межами як завдяки безумовному авторитетові його фундатора і керівника, так і завдяки його співробітникам, які успішно співпрацюють з відомими науковими центрами, отримують міжнародні гранти на проведення спільних досліджень, публікують результати своїх досліджень у провідних українських і міжнародних наукових журналах. Деякі з них регулярно проходять стажування за кордоном.

Спеціально для молодих науковців за ініціативою Сергія Васильовича та за його участю у 2003 р. на базі відділу молекулярної імунології Інституту біохімії було проведено міжнародну школу-семінар Федерації європейських біохімічних товариств «Сучасні методи молекулярної імунології» (*FEBS Advanced Courses «Modern techniques in molecular immunology»*). У роботі семінару взяли участь декілька провідних учених світу, зокрема давні друзі-колеги С. Комісаренка, академіки Національної академії наук США – колишній директор Інституту молекулярної генетики Кельнського університету *К. Раєвський* (ФРН) та колишній президент Вайцманівського інституту *М. Села* (Ізраїль), а також *П. Рад* (Велика Британія), *У. Хельман* (Швеція)



та Р. Мерно (США). Завдяки організації і проведенню школи-семінару було суттєво модернізовано частину лабораторних кімнат відділу, що дозволило впровадити в дослідження сучасні методи молекулярної біології.



**Учасники курсів FEBS в Інституті біохімії.
Перший ряд – лектори (зліва – направо): С. Комісаренко, М. Села (Ізраїль),
К. Раєвський (ФРН), У. Хельман (Швеція), П. Рад (Британія),
О. Корнелюк, Р. Мерно (США). Київ, 2003.**

Загалом, за роки, що минули, співробітникам відділу разом із Сергієм Васильовичем доводилося багато займатися науково-організаційною роботою: вони відповідали за організацію і проведення численних республіканських і міжнародних конференцій, семінарів та шкіл з молекулярної імунології.

Талановитий та багатогранний, Сергій Васильович Комісаренко є вченим з дивовижно широким колом інтересів, які виходять далеко за межі біологічної і медичної науки. Наукова полівалентність (медицина, біохімія, молекулярна біологія, імунологія, біотехнологія, нанобіотехнологія) доповнена бездоганною ерудицією. Вчений-сподвижник все своє життя присвятив не лише дослідженню, але й практичному розв'язанню гострих проблем охорони здоров'я людей. І ці якості він хоче бачити й у молодого покоління науковців, яких він всіляко підтримує, й у своїх колег, з якими щедро ділиться здобутими новими знаннями, міркуваннями, планами. Для цього він використовує будь-яку нагоду: чи то засідання вченої ради інституту, головою якої він є, чи то трибуну Українського біохімічного конгресу, який він регулярно скликає як президент Українського біохімічного товариства, чи то українсько-польську Парнасівську конференцію, постійним співголовою оргкомітету якої він є, і яка відбувається раз на два роки під егідою Українського і Польського біохімічних товариств (з 2011 р. до них приєдналося Ізраїльське товариство біохіміків і молекулярних біологів), або інші численні форуми. До речі, цього ювілейного року Парнасівська конференція проходитиме в Києві (3–5 вересня).

Високий міжнародний авторитет Сергія Васильовича як науковця, його тісні наукові зв'язки з ученими світового рівня суттєво піднімають статус



української науки, допомагають нашим науковцям долучитися до загального світового наукового простору. Важко навіть просто згадати і перелічити іноземних колег, з якими Сергій Васильович підтримує дружні і професійні стосунки, серед яких є чимало нобелівських лауреатів.



Фото зліва: академік С. Комісаренко знайомить лауреата Нобелівської премії Аарона Чіхановера (Ізраїль) з дослідженнями Інституту біохімії імені О. В. Палладіна. Київ, 2008.



Фото справа: лауреат Нобелівської премії Жан-Марі Лен (Франція) обговорює із С. Комісаренком результати експериментів. ІБХ, Київ, 2008.



Фото зліва: президент Польської академії наук, біохімік, професор Анджей Легоцький в Інституті біохімії імені О. В. Палладіна. 2005



Фото справа: на Конгресі FEBS в Туреччині. Лауреат Нобелівської премії Аарон Чіхановер (Ізраїль), президент FEBS Юланта Баранська (Польща) і президент Українського біохімічного товариства Сергій Комісаренко. Стамбул, 2006

Про Сергія Васильовича як про талановитого науковця і організатора науки можна говорити безкінечно, наводячи багато переконливих фактів з його наукової біографії, які за браком формату статті залишаються поза текстом. Проте буде несправедливим не згадати, хоча б побіжно, про його величезну громадсько-політичну роботу, що насправді потребує написання окремих статей або есе.



Чималий внесок зробив Сергій Васильович у розбудову незалежної України та її столиці, поєднуючи наукову роботу з діяльністю на відповідальних державних посадах. 1990 року Верховна Рада УРСР обрала його заступником Голови Ради Міністрів УРСР. На цій посаді та на посаді Заступника Прем'єр-Міністра України за неповні два роки С. Комісаренко ініціював, або брав активну участь у розробці низки перших архіважливих законів України з гуманітарних питань. Як справжній патріот і знавець Києва, на посаді заступника Голови Уряду України С. В. Комісаренко ініціював відзначення 50 років трагедії у Бабиному Яру на міжнародному рівні та впорядкування місця цієї трагедії.

Він був також ініціатором відновлення Києво-Могилянської Академії, організації музею Івана Гончара, передачі приміщення музею Леніна Українському Дому та будинку синагоги Бродського, де знаходився Театр ляльок по вул. Шота Руставелі, єврейській громаді тощо.

У травні 1992 року С. Комісаренко був призначений першим Послом України у Великобританії, а з 1995 року – і в Ірландії за сумісництвом. Працюючи Послом, він максимально сприяв розвитку двосторонніх стосунків: заснував у Лондоні благодійний фонд допомоги чорнобильцям та Британо-Українську торговельну палату, ініціював вступ України до директорату Європейського банку реконструкції та розвитку і до Міжнародної морської організації, організував безкоштовну передачу Україні Британської Антарктичної станції «Фарадей» (зараз «Академік Вернадський»), яка стала центром полярних досліджень у нашій країні. Посол С. Комісаренко успішно лобював підтримку Британською делегацією прийняття України до Ради Європи, ратифікацію Британським парламентом угоди про співробітництво між Україною та Європейським союзом тощо.

С. В. Комісаренко – автор численних статей не тільки про науку, але й про культуру, політику тощо. Його роздуми щодо цих питань – це розмірковування небайдужої людини, громадянина з активною життєвою позицією.

Він справжній патріот України з почуттям високої відповідальності та турботи за державу та її майбутнє. Так, у 2001 р. його було запрошено зробити головну доповідь у штабі ООН на міжнародній конференції, присвяченій 15-річчю аварії на Чорнобильській АЕС. У 2002 р. він виступав від України у Брюсселі на міжнародній конференції «Декілька Європ та трансатлан-



**Віце-прем'єр-міністр УРСР С. Комісаренко розповідає Президенту США Дж. Бушу про трагедію у Бабиному Яру (поруч – пані Б. Буш, Голова Верховної Ради УРСР Л. Кравчук).
Київ, Бабин Яр, 1 серпня 1991**



тичні стосунки», у 2003 р. робив доповідь в Інституті Кеннана у Вашингтоні «Україна між виборами 2002–2004», а у Кентському університеті (США) був почесним доповідачем з лекцією про вплив аварії на Чорнобильській АЕС на екологію у світі. У 2005 р. Сергія Васильовича було запрошено Королівською академією наук Канади виступити із серією доповідей в різних університетах Канади.



Фото зліва: посол України у Великій Британії Сергій Комісаренко та Державний міністр іноземних справ Великої Британії Дейвід Девіс підписують Меморандум про безкоштовну передачу Україні антарктичної станції «Фарадей». Лондон, Форін Офіс, 20 липня 1995.

Фото справа: Посол України у Великій Британії Сергій Комісаренко відкриває виставку творів українського мистецтва в Галереї Корк у присутності брата Королеви Герцога Глостерського Річарда. Лондон, 1995.

Починаючи з 2005 р., він щорічно представляє Україну як експерт і виступає від її імені на міжнародних форумах найвищого рівня з питань біобезпеки та біозахисту (Швейцарія, Велика Британія, Фінляндія, Хорватія, Франція, Швеція, Німеччина, Грузія, Таїланд, Угорщина, ПАР, інші), проводить в Україні Міжнародні конференції і семінари «Біобезпека і біозахист».

С. Комісаренко активно й успішно займається громадською і добродійною діяльністю. Його обрано: першим заступником голови Української Ради миру, президентом Українського Інституту миру і демократії, Президентом благодійної організації інвалідів «Спеціальна Олімпіада України», головою Наглядової ради Міжнародного фонду Національної пам'яті України, Почесним членом та членом Ради директорів Британо-Української торговельної палати. Указами Президента України у вересні 2007 р., у червні 2009 р. та 20 листопада 2017 р. С.В. Комісаренка було призначено головою Комісії з біобезпеки та біозахисту при РНБО України, він, фактично, є головним експертом з біобезпеки в Україні. Він є членом редколегій міжнародного журналу «Європа» (Польща) та журналу з імунофармакології (Італія), членом Ради міжнародного товариства імунофармакологів (США), головним редактором «Українського біохімічного журналу» (*The Ukrainian Biochemical Journal* – з 2014 р.) та журналу «Біотехнологія» (*Biotechnologia Acta* – з 2014 р.).

Сповідуючи філософію добра і добродійності, Сергій Васильович приділяє багато уваги і особливо опікується діяльністю благодійної організації інвалідів «Спеціальна олімпіада України», бере безпосередню участь в ор-



ганізації проведення спортивних занять та змагань для людей з вадами розумового розвитку як в Україні, так і за кордоном. Він все робить для того, щоб «Спеціальна олімпіада України» також стала популярною благодійною організацією в Україні, якою СО є у світі. Бо що може бути благороднішим, ніж допомога людям-інвалідам із цією нозологією!



Делегація України на чолі із Сергієм Васильовичем на зимових та літніх іграх «Спеціальної Олімпіади». США, відповідно 2009, 2015

У своєму рідному Інституті академік Комісаренко працює з 1966 р. Кожен із співробітників, хто спілкувався з ним, вирішуючи будь-які питання – наукові, науково-організаційні, громадські, або слухав виступи С. Комісаренка, відчув на собі привабливість його особистості – високоосвіченої та високообдарованої людини, яка має ґрунтовні, енциклопедичні знання з різних галузей не лише біології та медицини і взагалі природознавства, але й суспільних наук, літератури, мистецтва (живопису, музики, театру), досконало володіє кількома іноземними мовами.

У життєвій круговерті, коли розписана чи не кожна хвилина, у С.В. Комісаренка знаходиться час на сім'ю – він глибоко шанує пам'ять своїх батьків, обох обожнює чарівну дружину Наталю Борисівну, інженера-будівельника за освітою, та улюблену доньку Ганну.

Сьогодні Сергій Васильович – дійсний член (академік) Національної академії наук України (імунологія, 1991), дійсний член (академік) Національної академії медичних наук України (імунологія, 1993), доктор біологічних наук (молекулярна біологія, біохімія), професор (біохімія), лауреат Державної премії України (1979) та премій НАН України: імені О. В. Палладіна (2003), імені І. І. Мечникова (2012), академік-секретар Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біо-



З дружиною і донькою. Київ, 2003



логії, член Президії НАН України. Фактично академік С.В. Комісаренко відповідає в НАН України за медико-біологічні дослідження і за зв'язок з Національною академією медичних наук України, де він також є членом президії.

Він нагороджений почесними відзнаками Президента України: орденом «Ярослава Мудрого» V ступеня (2005), орденом «За Заслуги»: III (1996), II (1998) і I (2013) ступеня, найвищою нагородою КНР для іноземців – орденом «Дружба» (2012), Почесною Грамотою Верховної Ради України (2003), почесним званням «Заслужений діяч науки і техніки України» (2008), Почесними грамотами Кабінету Міністрів України (2003, 2013), Дипломом лауреата Премії Кабінету Міністрів України за розроблення і впровадження інноваційних технологій (2017) тощо.



Вручення ордену «Дружба» – найвищої нагороди КНР для іноземців Головою Всекитайських зборів народних представників професору С. Комісаренку. Пекін, 2012



Відділ молекулярної імунології ІБХ. Київ, 2013

Він обраний почесним доктором Кінгстонського та Північно-Лондонського Університетів (1997), почесним професором Одеського національного університету імені І.І. Мечникова (2010) та Інституту мікробіології і імунології імені І. І. Мечникова НАМН України (2011), почесним членом Польсько-



го біохімічного товариства (2011) та Всесвітньої організації імунопатологів (2013). Має Ранг Надзвичайного і Повноважного Посла України (1992).

Та чи не найголовнішим і найвагомим науковим здобутком С. Комисаренка є створення в Україні нового напрямку досліджень – молекулярної імунології, а разом з ним – наукової школи, представники якої, у свою чергу, вже стали відомими вченими як у нашій країні, так і за її межами.

Своє 75-річчя Сергій Васильович зустрічає сповненням нових ідей, задумів і планів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Комисаренко С. В. О возможной природе неспецифических иммуноглобулинов в клетке // Цитология и генетика. – 1978. – Т. XII, № 6. – С. 541–543.
2. Комиссаренко С. В. Получение моноклональных антител и применение моноспецифических и моноклональных антител в иммунохимическом анализе // Физиол. журн. – 1982. – Т. 28, № 4. – С. 477–485.
3. Пат. 40714 А UA. 7МПК C01B15/16, A61K 31/327. *Противухлинний засіб (МЕБІФОН)* / Комисаренко С. В., Шарикіна Н. І., Лозинський М. О., Карлова Н. П., Кудрявцева І. Г., Кузьменко І. Й., Борисевич А. М., Єзерська Л. Я.; заявники та патентовласники Ін-т біохімії ім. О. В.Палладіна НАН України, Ін-т фармакології та токсикології АМН України, Ін-т органічної хімії НАН України. – №2001074659; заявл. 04.07.01; опубл. 15.08.01. Бюл. № 7.
4. Komissarenko S. V., Penezina O. P., Fomovskaya G. N. Selective killing of tumor cells in vitro by immunotoxin composed of antitumor antibiotic streptonigrin and polyclonal specific anti bodies // Intern. J. Immunopharmacology. – 1994. – V. 16, N 12. – P. 1053–1058.
5. Komisarenko S. V. Antigenic determinants of proteins and peptides / Chemistry of Peptides and Proteins. – Berlin – N.Y.; Eds.: W. Voelter, E. Bayer, Y. Ovchinnikov, V. Ivanov. Berlin–New-York.: Walter de Gruyter & Co. – 1986. – V. 3. – P. 235–247.
6. А.с. 1379739 SU, 4 МПК G01 № 33/49. Способ прогнозирования осложненного течения инфаркта миокарда / Комиссаренко С. В., Скок М. В., Гватуа Н. А., Солоненко И. Н., Пивень В. И. (SU). – Заявл. 27.01.86; Опубл. 07.03.88, Бюл. № 9 – ДСП.
7. Комиссаренко С. В., Зак К. П., Комаров Ф. И., Синапальников И. В., Марасанов Р. А., Черняк С. И., Мельников О. Ф., Бережная Н.М., Карлова Н.П. Состояние иммунной системы у людей, участвовавших в ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС // Радиационные аспекты Чернобыльской аварии (сб. в двух частях). Часть II. Эколог. и радиобиол. проблемы. – Киев, 1989 г. – С. 262–266).
8. Пат. 69283 U UA, МПК А 61К 39/44 (2006.01). Тест-система імуноферментна для кількісного визначення розчинного фібрину в плазмі крові людини / Комисаренко С. В., Луговської Е. В., Колеснікова І. М., Співак М.Я., Гриценко П. Г., Ганова Л. О., Луговська Н. Е., Литвинова Л. М., Ляшко К. Д., Костюченко О. П., Позняк Т. А., Гоголинська Г. К., Ковтонюк Г. В.,



Терещенко М.І.; – заявники та патентовласники Інститут біохімії ім. О. В.Палладіна НАН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. – № u201111736; – заявл. 05.10.2011; опубл. 25.04.2012. Бюл. № 8.

9. Пат. 69284 U UA, МПК А 61К 39/44 (2006.01). Тест-система імуноферментна для кількісного визначення D-димеру в плазмі крові людини / Комісаренко С. В., Луговської Е. В., Колеснікова І. М., Співак М. Я., Гриценко П. Г., Ганова Л. О., Луговська Н. Е., Литвинова Л. М., Ляшко К. Д., Костюченко О. П., Позняк Т. А., Гоголинська Г. К., Ковтонюк Г. В., Терещенко М. І.; – заявники та патентовласники Інститут біохімії ім. О. В.Палладіна НАН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України. – № u201111736; – заявл. 05.10.2011; опубл. 25.04.2012. Бюл. № 8.

10. Пат. 70456 U UA, МПК А 61К 39/44 (2006.01). Тест-система імуноферментна для кількісного визначення фібриногену в плазмі крові людини / Комісаренко С. В., Луговської Е. В., Колеснікова І. М., Співак М.Я., Гриценко П. Г., Ганова Л. О., Луговська Н. Е., Литвинова Л. М., Ляшко К. Д., Костюченко О. П., Позняк Т. А., Гоголинська Г. К., Ковтонюк Г. В., Терещенко М. І.; – заявники та патентовласники Інститут біохімії ім. О. В.Палладіна НАН України, Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України. – № u201114516; – заявл. 07.12.2011; опубл. 11.06.2012. Бюл. № 1.

11. Пат. 84356 UA. МПК (2006) А61К 39/44, А61К 47/48, С07К 7/08 (2006.01); С12N 15/11. Штамм *Esherichia coli* K12 “inv” sbA – продуцент рекомбінантної неактивної субодиниці А дифтерійного токсину *Corynebacterium diphtheriae*, гібридизованої з полігістидиновим тагом / Комісаренко С. В., Колибо Д. В., Романюк С. І., Кабернюк А. А., Олійник О. С., Редчук Т. А.; заявник і патентовласник Ін-т біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України – № a200701085; заявл. 02.02.2007; опубл. 10.10.2007, Бюл. № 19.

12. Пат. 84357 UA. МПК (2006) А61К 39/44, А61К 47/48, С07К 7/08 (2006.01); С12N 15/11. Штамм *Esherichia coli* K12 “inv” sbB – продуцент рекомбінантної неактивної субодиниці В дифтерійного токсину *Corynebacterium diphtheriae*, гібридизованої з полігістидиновим тагом / Комісаренко С. В., Колибо Д. В., Романюк С. І., Кабернюк А. А., Олійник О. С., Редчук Т. А.; заявник і патентовласник Ін-т біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України – № a200701086; заявл. 02.02.2007; опубл. 10.10.2008, Бюл. № 19.

13. Пат. 100065 U Україна, МПК G01N 33/49 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01), G01N 33/531 (2006.01). Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до *Mycobacterium bovis* / Комісаренко С. В., Колибо Д. В., Олійник О. С., Редчук Т. А., Луговська Н. Е., Сіромолот А. А., Стегній Б. Т., Герілович А. П., Завгородній А. І., Ніколаєнко І. В., Раєвська Г. Є., заявник і патентовласник Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. – № u201413675; заявл. 19.12.2014; опубл. 10.07.2015, Бюл. № 13.)

14. Пат. 85494 Україна, МПК (2009.01): А 61 К 31/66 (2006.01), А 61 К 33/06 (2006.01), А 61 К 31/593 (2006.01), А 61 Р 19/00. Фармацевтична композиція для лікування захворювань кісткової тканини / Комісаренко С. В., Колибо Д. В., Апуховська Л. І., Безусяк А. І., Василевська В. М.; заявник і патентовласник Ін-т біохімії ім. О. В.Палладіна НАН України. – № a200802015; заявл. 18.02.08; опубл. 10.06.08, Бюл. № 11).



ХІІІ МІЖНАРОДНА ЛІТНЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦІЯ «МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» за тематичним напрямом «Біоінформатика»

З 4 червня по 20 червня 2018 року на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова спільно з Інститутом мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, за підтримки Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського та Співки біологів і біотехнологів Одеси проходила ХІІІ Міжнародна Літня школа-конференція «Молекулярна мікробіологія і біотехнологія» за основним тематичним напрямом Біоінформатика.

На сьогоднішній день цей напрямок стрімко розвивається і зачіпає не тільки області чистої біологічної науки. Для тих, хто хоче працювати в галузі геноміки, протеоміки, метагеноміки, танскріптоміки, метаболоміки і інших «омік» від біоінформатики мало класичної біологічної освіти. Вимоги до молодих вчених-біоінформатиків набагато серйозніші і їм необхідні додаткові знання в області основ програмування, роботи з системою Unix / Linux, розуміння організації і побудови запитів в базах даних і розуміння багатьох специфічних програм для кожної з вище перерахованих областей біоінформатики.

Саме тому організатори літньої школи-конференції при Одеському національному університеті вважали за необхідне присвятити останні дві школи напрямку Біоінформатика. Основним завданням школи було висвітлити базові моменти, з якими зіткнуться молоді вчені, які бажають реалізувати себе в даній перспективній галузі науки, яка активно розвивається за кордоном. Недостатня активність в пропагуванні біоінформатики в Україні було ще одним додатковим аргументом при прийнятті рішення про присвячення Літньої школи цьому напрямку.

Серед слухачів Літньої школи-конференції були молоді вчені та аспіранти з університетів та наукових закладів України (Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Дніпровського національного університету ім. Олеса Гончара, Запорізького національного університету, Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Київський національний університет імені Тараса Шевченка).

У роботі школи як лектори брали участь заступник директора ІМВ НАНУ завідувач відділом молекулярної генетики бактеріофагів, член-кор. НАНУ, д.б.н. Товкач Федір Іванович, д.б.н., професор, член-кор. НАНУ, завідувач відділу білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ, завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики Київського національного університету імені Тараса Шевченка Корнелюк Олександр Іванович, д.б.н., професор, член-кор. НАНУ, завідувач відділу молекулярної біології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна Мінченко Олександр Григорович, к.б.н., с.н.с., зав. лабораторією біоінформатики та структурної біології Інституту харчової біотехнології та геноміки НАНУ Карпов Павло Андрійович, ст.н.с. Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, секретар Української асоціації біобезпеки (УАБ), к.б.н. Гергалова



Галина Леонідівна, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова к.б.н. Васильєва Наталія Юріївна, доцент кафедри комп'ютерної алгебри та дискретної математики ОНУ імені І. І. Мечникова, к.фіз-мат.н. Савастру Ольга Володимирівна, професор Інституту сільського господарства м. Нант (Франція) Томас Ертле, професор університету Брайтона Сергій Міхаловський, науковий співробітник університету Брайтона к.х.н. Любов Міхаловська, професор Департаменту медичних біосенсорів Алексій Шмідт та науковий співробітник кафедри медичної хімії та біофізики університету Умеа к.б.н. Олена Рахімова (Швеція).

Лекційний курс ХІІІ Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології висвітлював питання бактеріальної геноміки, геноміки бактеріофагів і островів патогенності, геноміки плазмід, сучасного погляду на еволюцію мікроорганізмів, наукових концепцій в молекулярній мікробіології, бактеріальних транспозонів, IS-елементів, інтегронів і генетичних касет, структурної біоінформатики. Досить багато часу було присвячено питанням клонування білків.

Одним з занять для слухачів школи були лекції проф. Сергія Міхаловського, які він присвятив актуальним питанням подання проектів і пошуку партнерів серед світової наукової спільноти. На цих заняттях перед слухачами були детально розкриті підходи і вимоги до написання спільних проектів. На своєму прикладі він розповідав слухачам школи як необхідно проводити підготовки до написання проектів, пошуку партнерів, демонстрував ресурсні сайти, які необхідно відвідати перед написанням подібних проектів.

Протягом першого тижня лекційних занять студенти ХІІІ Літньої школи-конференції мали можливість прослухати лекції проф. Алексія Шмідта, які були присвячені актуальним в біології проблемам клонування білків. Були детально розглянуті усі етапи, необхідні для проведення даного дослідження. Перед студентами, протягом декількох лекційних днів, на основі практичних завдань, продемонстровано етапи клонування, експресії, виділення і очищення білків.

Не менш цікавими і актуальними були лекції Олени Рахімової присвячені темі «Quality in Science». Правила, нормативи і, так би мовити, «підходи за замовчанням» до якості матеріалу, який планується опублікувати, дозволили слухачам зрозуміти чому в деяких випадках статті не можна віднести до наукових матеріалів, а скоріше до газетних публікацій.

Член-кор. НАНУ Федір Товкач – один з організаторів нашої школи прочитав лекції присвячені організації хромосоми *Escherichia coli* з висвітленням останніх опублікованих робіт по цій темі і загальної топології бактеріальних геномів та лекції, присвячені бактеріофагам і вірусам.

Цікавими і інформативними були лекції професора Томаса Ертле (університет Нант, Франція), який на власних дослідженнях показав необхідність інтеграції підходів класичної мікробіології і методів біоінформатики *in silico*.

Більша частина часу була віддана саме практичним заняттям. Орієнтуючись на тенденції світової спільноти і вимоги до більшості програм біоінформаційного напрямку, були проведені заняття з ознайомлення з операційною



системою (ОС) Linux. Приклади, які відпрацьовували на заняттях, дозволили студентам зрозуміти основні принципи роботи з файлами в терміналі.

Були проведені практичні заняття по основах роботи з мовою програмування R. Слухачі школи мали можливість ознайомитись з R GNU, зрозуміти основні принципи програмування в R, попрацювати з основними пакетами, які використовуються для первинної обробки біоінформаційних даних.

Оскільки основи аналізу неможливі без розуміння основних форматів та типів даних, які використовуються в біоінформатиці, паралельно проходили заняття присвячені біологічним базам даних, підходам до пошуків необхідної інформації, її завантаженню та збереженню. На початку школи основну увагу приділяли NCBI і роботі саме в цій базі. Слухачів коротко ознайомили з правилами побудови складних запитів в NCBI, роботі з PubMed, BLAST, Primer-BLAST. Додатково були розглянуті такі програми як Primer3, Primer3Plus, Oligoanalyzer і інші.

Завершували цей блок літньої школи-конференції лекції та практичні заняття з філогенетичного аналізу. Об'єднуючи отримані раніше знання слухачі школи мали можливість провести пошук, відбір та сортування інформації в базі даних, сформувати файл, який містить первинну генетичну інформацію у необхідному форматі і провести філогенетичну реконструкцію як в он-лайн програмах так і в програмі R GNU. Додатковий час було приділено методам кластерного аналізу, як окремого напрямку в біології, так і основі для філогенетичної реконструкції.

Велика частина лекційного часу була присвячена питанням біоінформатики і її застосуванню в сучасній біології, а саме структурній біоінформатиці. Заняття з Павлом Карповим були присвячені особливостям досліджень *in silico* та взаємодії біоінформатики з іншими галузями, специфічності генетичного коду та сучасним методам його аналізу; методам вирівнювання послідовностей, фолдингу білків, аналізу тривимірних структур та ідентифікації функції білка на підставі структури і доменного складу. Додатково були розглянуті питання пов'язані з використанням бібліотек низькомолекулярних хімічних сполук: PubChem, ZINC, RCSB PDB Ligands (Ligand Expo), KEGG LIGAND, BindingDB; бібліотеки макромолекулярних мішеней, лігандів і ліганд-білкових комплексів, як основи раціонального драг-дизайну, молекулярного докінгу та високопропускного віртуального скринінгу. Слухачі отримали навички роботи з доменами: прогноз доменної архітектури *in silico*; інструменти SMART, Pfam, PROSITE, HMM (Hidden Markov Model's); порівняння та вирівнювання структури білків, навчилися візуалізувати тривимірні молекулярні моделі *in silico*.

Член-кор. НАНУ Олександр Корнелюк доповнював отриману на практичних заняттях інформацію теоретичною базою, пояснюючи слухачам основні підходи до аналізу білків з точки зору протеоміки і біоінформатики. Він розповів слухачам про появу нових можливостей для створення нових лікарських препаратів шляхом комп'ютерного дизайну і про розроблений та впроваджений в Інституті молекулярної біології і генетики комп'ютерний сервіс для аналізу динаміки білків у віртуальній лабораторії MolDynGrid, який є частиною проекту розвитку Грід-сегменту НАН України з обчислювальними



кластерами Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Інститутів молекулярної біології і генетики, клітинної біології і клітинної інженерії, теоретичної фізики тощо.

Дуже цікавими були лекції член-кор. НАНУ Олександра Мінченка, присвячені молекулярним механізмам стресу клітини, а саме стресу ендоплазматичного ретикулула як фундаментального явища, що забезпечує перебіг різних метаболічних та фізіологічних процесів у нормі, особливо в деяких спеціалізованих клітинах із високим рівнем синтезу секреторних протеїнів.

Останній тиждень школи-конференції був присвячений ще одному не біологічному, але важливому біоінформаційному аспекту – навичкам програмування з використанням Python и Віорpython. На практичних заняттях слухачів школи доц. кафедри комп'ютерної алгебри та дискретної математики ОНУ Ольга Савастру ознайомила з основами роботи з використанням Python і основними пакетами та бібліотеками для базового біоінформаційного аналізу даних.

Наполегливість слухачів і їх бажання опанувати максимальну кількість матеріалу і щире бажання викладачів поділитися тим, що вони знають і вміють нівелювали «підводні камені» при знайомстві класичної біології та прикладних аспектів біоінформатики.

Доцент кафедри мікробіології, вірусології і біотехнології
Васильєва Н. Ю.



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, діагностичуми, мікробні технології в сільському господарстві, мікробні технології у харчовій промисловості; захист та оздоровлення навколишнього середовища; отримання енергоносіїв та нових матеріалів тощо.

Мова (мови) видання: українська, російська, англійська.

Рубрики журналу: “Оглядів та теоретичні статті”, “Експериментальні праці”, “Дискусії”, “Короткі повідомлення”, “Хроніка наукового життя”, “Сторінки історії”, “Ювілеї і дати”, “Рецензії”, “Книжкова полиця”.

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

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

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

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

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



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

- Реферат англійською мовою:

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

- Повний текст статті мовою оригіналу.

Текст статті має включати такі складові:

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

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

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

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

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

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



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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

Розділ “Матеріали і методи”:

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

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

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

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

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



Список використаної літератури

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

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

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

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

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

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

Назви статей наводять англійською мовою.

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

Зразки посилання літератури

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

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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



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

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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

1. Лопатина Н. В., Терентьев А. Н., 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 GdYVO₄:Eu³⁺ with cell nuclei. Dop Nats Akad Nauk Ukr. 2010;(10):81–86.

Книги:

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

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

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

Матеріали з'їздів, конференцій:

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



Yin R, Francis F, Bragard C, Liu Y, Chen J. Study on transmission efficiency of CMV transmitted by Myzus persicae from different places. In: Proceedings of 9th International Symposium on Aphids, Beijing, China. 2013:49–50.

Диссертационные работы:

Koreneva AA. Biological properties of medicinal plants viruses. PhD thesis, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2009: 22.

Сборники:

Dunich A, Mishchenko L. Heavy metals content in virus infected purple coneflower plants. Bull T Shevchenko Nat Univ Kyiv Ser Biol. 2013; 65(3):22–26.

Rose PI. Gelatin. In: Encyclopedia of polymer science and engineering Eds: Mark HF, Bikales NM, Overberger CG, Menges G, Kroschwitz JI New York: Wiley; 1987;7, 2nd ed. 488–513.

Shrago MI, Guchok MM, Kalugin YuV. Some principles of direct synthesis of cryoprotectants. In: Current Problems of Cryobiology. Eds. Pushkar NS and Belous AM. Kiev: Naukova Dumka, 1981:157–201.

Патенти, заявки:

A.s. 4411066/14 SSSR, MBI G 01 N 33/50. A method of determining bile acids in biological fluids. Veselskiy SP, Lyashchenko PS, Лукьяненко IA. (SSSR). – N 1624322; zayavl. 25.01.1988; opubl. 30.01.1991, Byul. N 4.

Статті з електронних журналів:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53, available at: www.ascusc.org/jcmc/vol5/issue2/

За наявності в статті DOI (Digital Object Identifier), яка є міжнародним ISO стандартом (<http://www.doi.org/>), в списку літератури бажано вказати її ідентифікатор, наприклад:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53. Cited 2 times. doi: 10.1134/S1023193508080077

Датою надходження статті вважають день, коли до редколегії надійшов перший варіант тексту статті.

Після одержання коректури статті автор повинен виправити лише помилки і терміново відіслати статтю на адресу редколегії або повідомити про свої правки по телефону чи електронною поштою.

У разі затримки редакція, додержуючись графіка, залишає за собою право здати коректуру до друкарні (у виробництво) без авторських правок.

Підпис автора у кінці статті означає, що автор передає права на видання своєї статті редакції. Автор гарантує, що стаття оригінальна; ні стаття, ні рисунки до неї не були опубліковані в інших виданнях.



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 20.09.2018 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 9,75. Тираж 100 пр.
Зам. № 1799

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