farm applications, challenges, limitations and future perspectives. *Plant Science Today*. 2025. DOI: https://doi.org/10.14719/pst.12073.

УДК 579.845:579.25:[577.21:582.26(26)]

ВИДІЛЕННЯ МЕТАГЕНОМНОЇ ДНК БАКТЕРІЙ, АСОЦІЙОВАНИХ ІЗ МОРСЬКИМИ МАКРОВОДОРОСТЯМИ, ЯК ПІДХІД ДО ПОШУКУ МІКСОБАКТЕРІЙ – ПРОДУЦЕНТІВ АНТИМІКРОБНИХ СПОЛУК

Іваніца В. Ю., Залеська М. А., Лісютін Г. В., Чабан М. М., Страшнова І. В.

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
E-mail: vitali_ivanitsa@stud.onu.edu.ua

Зростання антибіотикорезистентності серед патогенних мікроорганізмів зумовлює необхідність пошуку нових природних джерел антимікробних сполук. Одними з найбільш перспективних продуцентів біологічно активних вторинних метаболітів і літичних ферментів є міксобактерії – грамнегативні соціальні бактерії з великими геномами та високим біосинтетичним потенціалом [5]. Ці мікроорганізми здатні синтезувати широкий спектр структурно різноманітних природних сполук, включаючи полікетиди, нерибосомні пептиди та їх гібриди, багато з яких проявляють виражену антимікробну активність [1, 5].

Тривалий час дослідження міксобактерій були зосереджені переважно на наземних представниках, тоді як морські міксобактерії залишаються значно менш вивченою групою. Наявні на сьогодні дані свідчать, що більшість описаних морських міксобактерій належить до підпорядку *Nannocystineae* [1, 3]. Дослідження морських міксобактерій ускладнюється низькою щільністю їх популяцій у природних біотопах, а також труднощами їх культивування в лабораторних умовах [3]. У зв’язку з цим важливого значення набувають метагеномні підходи, які дозволяють досліджувати генетичне різноманіття мікробних спільнот без необхідності попереднього культивування мікроорганізмів [2, 3]. Аналіз метагеномної ДНК дає змогу

виявляти філогенетичні маркери, зокрема гени 16S рРНК [4]. Такий підхід дозволяє встановити наявність міксобактерій у певному біотопі та оцінити доцільність подальших досліджень [3].

Метою роботи було отримати метагеномну ДНК бактеріальних спільнот, асоційо-ваних з морськими макроводоростями, та детектувати в ній гени 16S рРНК міксобактерій.

Метагеномну ДНК виділяли із бактеріальної фракції, асоційованої з морськими макроводоростями *Cladophora vadorum*, *Ulva lactuca*, *Ulva linza*, *Ulva intestinalis*, *Chaetomorpha aerea*, *Ceramium rubrum*.

Для відокремлення бактеріальних клітин від водоростей приблизно 10 г кожного зразка подрібнювали на фрагменти площею близько 2 см² та інкубували протягом 20 хв у 50 мл відмивочного буфера (100 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, 10 мМ EDTA, 0,5% Tween 80 або Tween 21) при кімнатній температурі на шейкері (180 rpm). Після інкубації великі фрагменти водоростей видаляли, а отриману суспензію послідовно центрифугували та фільтрували через мембранні фільтри з діаметром пор 0,22 мкм для концентрування бактеріальної фракції.

Виділення метагеномної ДНК проводили за модифікованим нами CTAB-методом із фенол-хлороформною очисткою. Мембранні фільтри з адсорбованими клітинами інкубували в CTAB-екстракційному буфері з протеїназою K при 55 °C, після чого проводили екстракцію сумішшю фенол : хлороформ : ізоаміловий спирт (25:24:1). Після відділення водної фази зразки обробляли RNase A, ДНК осаджували ізопропанолом, промивали 70% етанолом та ресуспендували у TE-буфері.

У результаті було отримано 30 мкл метагеномної ДНК з концентрацією 211 нг/мкл. Після додаткового очищення з використанням набору Qiagen PowerFecal концентрація ДНК становила 29 нг/мкл, при цьому показники чистоти відповідали вимогам для молекулярно-біологічних досліджень (A260/A280 = 1,80; A260/A230 = 2,14).

Для порівняльної оцінки було проведено виділення ДНК із використанням комерційних наборів Qiagen PowerFecal та Qiagen PowerSoil, які забезпечували нижчий вихід ДНК (35 та 14 нг/мкл

відповідно). Додатково було протестовано альтернативні методи екстракції на основі SDS, комбінацій SDS–лізоцим та SDS–CTAB. Отримані результати показали, що попереднє відмивання бактеріальних клітин від поверхні макроводоростей у буфері з неіонним детергентом у поєднанні з механічним струшуванням та з подальшою CTAB-екстракцією забезпечило ефективну десорбцію бактеріальних клітин.

Отриману ДНК тестували методом ПЛР з використанням універсальних бактеріальних праймерів 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) та 1492R (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′) для ампліфікації гена 16S рРНК. Для виявлення представників міксобактерій додатково використовували специфічні праймери: W1 (5′-CCGCGTGTGTGATGAAGGTC-3′), специфічний для підпорядку *Cystobacterineae* (пара W1/1492R), та W4 (5′-TTAGCAAGCACCGGCTAA-3′), специфічний для підпорядку *Nannocystineae* (пара W4/1492R). ПЛР-аналіз із використанням специфічних праймерів W1/1492R та W4/1492R, розроблених для селективної ампліфікації представників підпорядків *Cystobacterineae* та *Nannocystineae*, підтвердив наявність представників міксобактерій у бактеріальних спільнотах, асоційованих із дослідженими морськими макроводоростями. При цьому, у зразках із попереднім відмиванням бактерій інтенсивність ПЛР-сигналу була суттєво вищою порівняно з прямою екстракцією метагеному, що пояснюється збагачення зразка цільовою ДНК, зокрема міксобактерій.

Виділену метагеномну ДНК планується використати для секвенування ампліконів гена 16S рРНК з метою визначення таксономічного складу мікробних спільнот, асоційованих із морськими макроводоростями Одеської затоки Чорного моря, а також оцінки відносної чисельності міксобактерій у складі цих мікробіомів.

Список літератури

1. Bhat M.A., Mishra A.K., Bhat M.A., Banday M.I., Bashir O. et al. Myxobacteria as a source of new bioactive compounds: A perspective study. *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13(8). P. 1265. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081265

2. Chaudhari H.G., Prajapati S., Wardah Z.H., Raol G., Prajapati V. et al. Decoding the microbial universe with metagenomics: A brief insight. *Front. Genet*. 2023. Vol. 14. P. 1119740. https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1119740
3. Garcia R., La Clair J.J., Müller R. Future directions of marine myxobacterial natural product discovery inferred from metagenomics. *Mar Drugs*. 2018. Vol. 16(9). P. 303. https://doi.org/10.3390/md16090303
4. Pérez-Cobas A.E., Gomez-Valero L., Buchrieser C. Metagenomic approaches in microbial ecology: An update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. *Microb Genom*. 2020. Vol. 6(8). P. mgen000409. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000409
5. Saggu S.K., Nath A., Kumar S. Myxobacteria: Biology and bioactive secondary metabolites. *Research in Microbiology*. 2023. Vol. 174. P. 104079. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104079

УДК 581.143.6:58.036:582.998.1

ВПЛИВ СЕЗОННОСТІ НА ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ ТА РІСТ РОСЛИН ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДУ *CARLINA* L. В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Колісник Х. М., Грицак Л. Р., Прокоп'як М. З., Дробик Н. М.

Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка
E-mail: kolisnikhristina32@gmail.com

У контексті сучасного розвитку суспільства простежується стійка тенденція до збільшення обсягів використання фітосировини у фармацевтичному виробництві. Значна частка лікарських засобів, що застосовуються у медичній практиці, складається із сполук, отриманих з рослинного матеріалу. Проте надмірна та неконтрольована заготівля лікарських рослин спричиняє виснаження їх природних ресурсів і звуження ареалу, що становить загрозу для існування рідкісних видів. Перспективним напрямом подолання цієї проблеми є використання технологій культивування рослин *in vitro.* Застосування біотехнологічних методів дає змогу не лише