

УДК: 579.64:632.76

**МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ  
ОСОБЛИВОСТІ  
ЕНТОМОПАТОГЕННОГО  
ШТАМУ *BACILLUS*  
*THURINGIENSIS* 87/3**

**М.В. БОЙКО**, аспірант  
**Т.І. ПАТИКА**, доктор с.-г. наук,  
професор  
**М. В. ПАТИКА**, доктор с.-г. наук,  
чл.-кор. НААН  
Національний університет  
біоресурсів і природокористування  
України

Проведено порівняльний аналіз основних фізіолого-біохімічних властивостей штаму ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* (Bt)87/3 з аналогічними властивостями референтного штаму Bt 800. Встановлено, що за сукупністю культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних властивостей, зокрема розщеплення крохмалу та ескуліну, утворення каталази, АМК, розрідження желатину штам належить до групи *B.thuringiensis*. Здійснено молекулярно-біологічний аналіз штаму Bt 87/3, заснований на вивченні поліморфізму нуклеотидних послідовностей генів 16S рРНК. На підставі аналізу нуклеотидної послідовності 16S рРНК побудована дендрограма філогенетичних зв'язків між різними представниками бактерій роду *Bacillus*. Сиквенс 16S рРНК штаму зареєстровано та внесено до бази GenBank (MH719010). Проведені дослідження створюють базис для подальшого вивчення генотипу культур, перспективних для використання у біотехнології.

**Ключові слова:** *Bacillus thuringiensis*, культурально-морфологічні ознаки, фізіолого-біохімічні властивості, внутрішньовидова гетерогенність, молекулярно-біологічний аналіз, ідентифікація.

**Рис. 1. Літ.11.**

**Постановка проблеми.** Бактерії роду *Bacillus* широко поширені у природі, що зумовлює внутрішньовидову гетерогенність, а також їх високий біосинтетичний потенціал. Поліфункціональні властивості ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis*, обумовлені синтезом широкого спектру біологічно активних сполук, в тому числі антибіотиків, ендо- та екзотоксинів, ПАР, ферментів та ін. що визначають їх широке використання в якості основи для біологічних засобів захисту рослин [1].

На сьогоднішній день спостерігається тенденція до виділення та ідентифікації нових ентомопатогенних штамів, що більш ефективні за існуючі. Це пояснюється тим, що в межах кожного виду зустрічаються численні різновиди, форми, штами, які є природними варіантами або штучними мутантами з властивостями, що відрізняються від властивостей материнського штаму.

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Аналіз наукової літератури засвідчує про ефективність дії *Bt*, що обумовлена здатністю бактерії у процесі спороутворення синтезувати ендо та екзотоксини. Спектр та рівень синтезу токсинів кодується комплексом *Cry* генів, які забезпечують біологічну активність: цитолітичну, гемолітичну, ентомоцидну тощо [2, 3]. Зважаючи на штамову гетерогенність представників цього виду, пошук та ідентифікація нових ефективних штамів продуцентів біоінсектицидів та всебічне дослідження їх властивостей набуває все більшої актуальності. Для ідентифікації та характеристики виду бактерій використовують різні методичні підходи. Основним інструментом молекулярно-біологічного аналізу є порівняння близьких за структурою генів або білків, і перш за все, порівняння їх первинних послідовностей. Використовуючи комбінацію даних по вивченню 16S рРНК, можна підтвердити видову приналежність штамів і філогенетичні взаємозв'язки усередині виду [4].

**Умови та методика досліджень.** Мета дослідження – провести ідентифікацію нового штаму бактерій *B. thuringiensis* 87/3 за нуклеотидною послідовністю гена 16S рРНК та дослідити ключові ознаки фенотипу.

Дослідження проводились на базі Національного університету біоресурсів і природокористування України, кафедри екобіотехнології та біорізноманіття.

У роботі використано новий ентомопатогенний штам відселектований *in vitro* *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (*Bt* H<sub>1</sub>) №87/3, виділений з личинок природних популяцій листогризухих комах *Leptinotarsa decemlineata* Say (L<sub>4</sub>) в природно-кліматичній зоні Чернігівського Полісся. Після аналітичної селекції даний штам зберігається у робочій колекції непатогенних мікроорганізмів кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП. Референтний штам *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (*Bt* H<sub>1</sub>) 800, Федеральної державної бюджетної установи Всеросійського науково-дослідного інституту сільськогосподарської мікробіології, м. Санкт-Петербург, який використовується як виробничий штам-продуцент біопрепарату Бітоксикацилін.

Отримання чистих культур, визначення морфолого-культуральних властивостей, приготування послідовних розведень мікробних суспензій, культивування на рідких та агаризованих поживних середовищах проводили згідно загальноприйнятих у мікробіології та біотехнології методів [5]. Для культивування використовували універсальні поживні середовища: м'ясо-пептонний бульон (МПБ), Лурія Бертрані (LB).

Вивчення морфології бактеріальних клітин проводили мікроскопіюванням фіксованих препаратів, фарбованих основним фуксином Циля [5], а також за диференційованою методикою забарвлення В. Смирнова [6]. Мікроскопію проводили з використанням імерсії на світловому мікроскопі *Axio Scope* з фотофіксацією (збільшення 100), без імерсії на мікроскопі *Polivar* (збільшення 40). Фізіолого-біохімічні характеристики штаму вивчали відповідно до методичних рекомендацій з виділення та ідентифікації бактерій роду *Bacillus*.

Бактеріальну ДНК з чистих культур *Bt* виділяли згідно зі стандартною методикою [7]. Електрофоретичне розділення виділеної ДНК проводили в 1%-му агарозному гелі на основі 0,5% трис-ацетатного буфера – ТАЕ. Молекулярну масу фрагментів ДНК визначали за їх електрофоретичною рухливістю, використовуючи ДНК маркер (1kb Fermentas SM1163). Полімеразно-ланцюгову реакцію (ПЛР) для 16S рРНК проводили за стандартними протоколами в 4-канальному ампліфікаторі «Терцик» науково-виробничої фірми (НВФ) «ДНК-Технологія» (Росія) з використанням олігонуклеотидів SSU-642-F НААТНУГТGCCAGCAGC, SSU-1445-R GTCRTCCYDCSTTCCTC [8]. Результати ПЛР оцінювали електрофоретично в 1% агарозному гелі на основі 0,5% буфера ТАЕ. Для візуалізації фрагментів ДНК у ході електрофорезу в агарозний розчин вносили флуоресцентний барвник – бромистий етидій, в кількості 0,5 мкг/мл.

Після ампліфікації генів нуклеотидну послідовність отриманого амплікону визначали за допомогою секвенатора «ABI PRISM 310 Genetic Analyser» (Applied Biosystems, США) з використанням набору реактивів «BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit». Результат секвенування отримували шляхом порівняння прямої та зворотньокомплементарної послідовностей з використанням програми CLC Main Workbench (CLC bio). Гомологічні послідовності відбирали з бази даних GenBank.

Молекулярно-філогенетичний аналіз здійснено за допомогою методу максимальної правдоподібності. Для з'ясування систематичного положення досліджуваних штамів зі спорідненими було проведено вирівнювання відповідних нуклеотидних послідовностей у програмі ClustalW та побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків у програмі MEGA6 [9]. Дендрограма філогенетичних зв'язків між штамом *Bacillus thuringiensis* 87/3 та типовими штамми бактерій роду *Bacillus*, побудована на основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням двопараметричної моделі Кімури.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за допомогою пакета програм MS Excel.

**Виклад основного матеріалу дослідження.** За морфологією клітин ентомопатогенний штам *Bt* 87/3 є прямими короткими паличками із заокругленими кінцями, що розташовуються попарно або ланцюжками. Характеризуються як грампозитивні, некапсульовані та рухливі внаслідок наявності перетрихальних джгутиків. Під час росту на МПА штам *Bt* 87/3 продемонстрував здатність до утворення округлих сірувато-білих колоній з матовою дрібно-шорсткою поверхнею. Різноманітність біохімічних особливостей різновидів *Bt* обумовлює відмінності у спектрі їх дії і прояві інфекційних і патогенних властивостей у відношенні популяцій комах-шкідників. У процесі зберігання культур, пересівання та інших технологічних процедур можуть змінюватися фізіолого-біохімічні властивості штамів, тому

важливо проводити тестування аксенічних культур за ключовими фізіолого-біохімічними ознаками [10].

Вивчали фізіолого-біохімічні властивості штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 в порівнянні з штамом-продуцентом біопрепарату Бітоксубацилін – *Bt* 800. На поверхні рідких середовищ штами утворюють тонку плівку (вуаль), під плівкою стовпчик середовища прозорий, є осад, пігменту не утворюють, колір поживного середовища не змінюється. Індол та сірководень не використовують, редукують нітрати в нітрити. При культивуванні досліджуваних штамів на діагностичних середовищах показано, що у процесі росту бактерії здатні утворювати ацетил-метил-карбінол (АМК) на середовищах з пептоном і глюкозою. Ентомопатогенні штами *B. thuringiensis* 87/3, 800 проявляють здатність до гідролітичного розщеплення крохмалю. Зона гідролізу становить від 3,2 до 4,8 мм. Як джерело вуглецю засвоюють сахарозу, глюкозу і манозу, мають протеолітичну активність, яка проявляється у розрідженні желатину і пептонізації казеїну молока. Встановлено, що штам *Bt* 87/3 не володіє уреазною активністю. Подібність перелічених вище ознак вказує на спорідненість досліджуваного штаму *Bt* 87/3 з референтним *Bt* 800. Отже, за ключовими морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками *Bt* 87/3 споріднений з типовим представником виду *B. thuringiensis*. Але з огляду на внутрішньовидову гетерогенність *Bt*, штами можуть бути коректно ідентифіковані на рівні виду за допомогою молекулярно-біологічного аналізу.

Проведено молекулярно-біологічні дослідження штаму ентомопатогенних бактерій *Bt* 87/3, засновані на вивченні поліморфізму нуклеотидних послідовностей генів 16S рРНК. Отримані фрагменти послідовностей виділяли та секвенували для визначення родової спорідненості штаму *B. thuringiensis* 87/3. Для секвенування фрагментів ДНК були використані олігонуклеотидні праймери, що застосовувалися на етапі ампліфікації. Для встановлення поліморфних нуклеотидів у послідовності генів 16S рРНК за допомогою програми BioEdit Entropy Plot обчислювалася ентропія дисперсії для кожної позиції у вирівняних послідовностях ДНК. Поліморфними вважалися ті позиції, в яких ентропія перевищувала значення 0,3 [11].

Для встановлення родинних зв'язків здійснено філогенетичний аналіз і побудовано філогенетичне дерево за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням двопараметричної моделі Кімури. Отримані часткові послідовності, загальною довжиною 700 п.н., порівнювали з відомими у базі даних GenBank. Результати аналізу виявили 99% схожості з різними видами роду *Bacillus*. Отримані результати підтверджують належність штаму до роду *Bacillus*. На підставі аналізу нуклеотидної послідовності 16S рРНК була побудована дендрограма філогенетичних зв'язків між різними представниками бактерій роду *Bacillus* (рис.1).

Показано, що подібність секвенованих фрагментів 16S рРНК штаму *Bt* 87/3 з фрагментами *B.thuringiensis* ATCC 10792 склала 99%.

Таким чином, за допомогою молекулярно-філогенетичного аналізу послідовності гена 16S рРНК штаму *Bt* 87/3 встановлено, що виділений штам

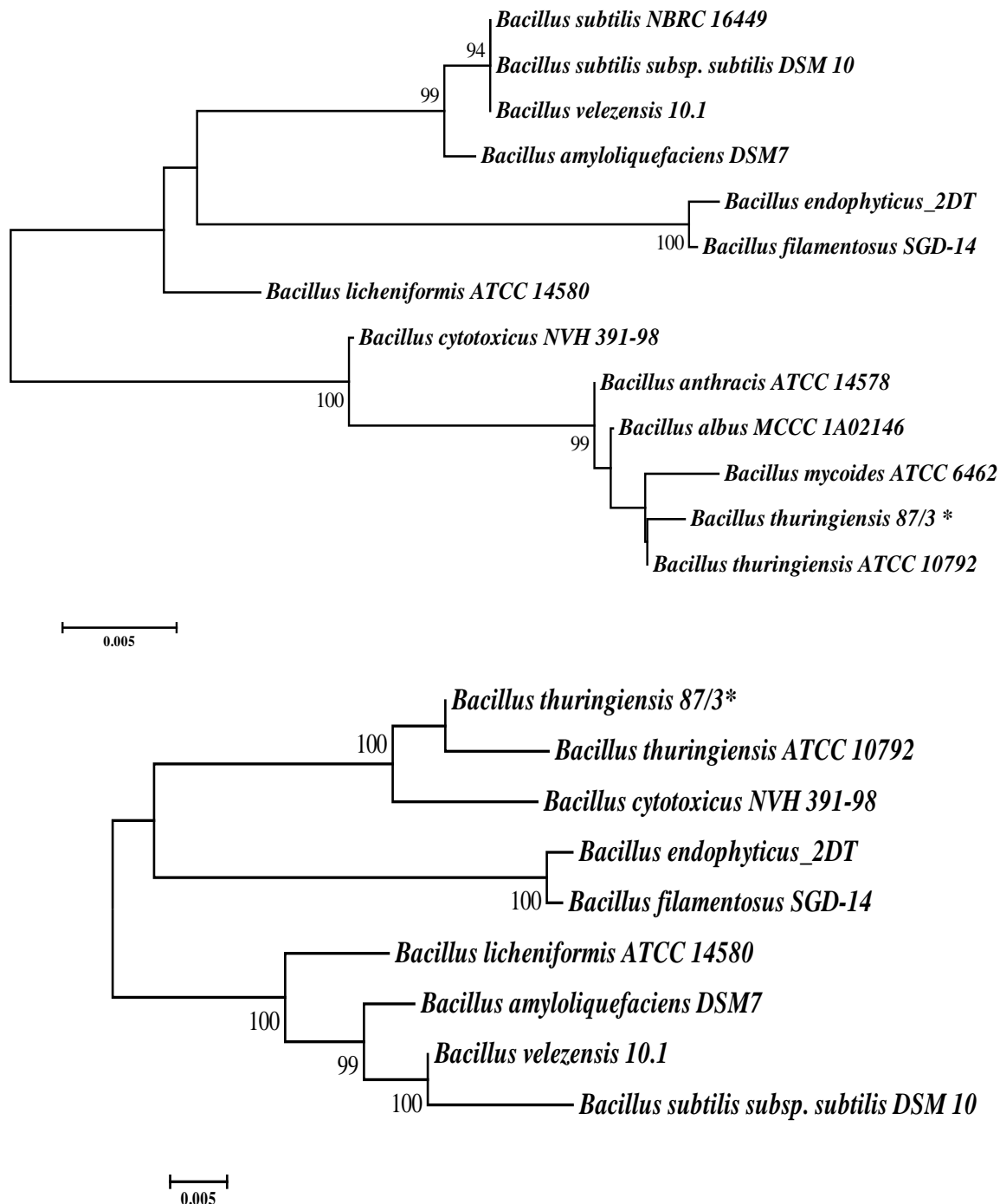


Рис. 1. Дендрограми філогенетичних зв'язків штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3.

Джерело: сформовано на основі власних досліджень

належить до виду *B. thuringiensis*. Сиквенс 16S рРНК штаму зареєстровано та внесено до бази GenBank (MH719010). Дана молекулярно-біологічна оцінка дає можливість на стадії лабораторного тестування штаму *Bt* 87/3 контролювати чистоту біопрепарату, відібрати зразки, що несуть ентомотоксини, а також

мають набір необхідних генетичних комбінацій, які зумовлюють біологічну активність та подібні до референтних штамів.

**Висновки і перспективи подальших досліджень.** Результати досліджень засвідчили, що за комплексом ключових фенотипічних ознак ентомопатогенний штам *Bt* 87/3 споріднений з типовими представниками виду *B. thuringiensis*. Показано, що визначені фізіолого-біохімічні показники штаму *Bt* 87/3 відповідають показникам еталонного штаму *Bt* 800 першого серотипу після зберігання. За допомогою молекулярно-філогенетичного аналізу послідовності гена 16S рРНК штаму *Bt* 87/3 встановлено, що виділений штам належить до виду *B.thuringiensis*. Сиквенс 16S рРНК штаму зареєстровано та внесено до бази GenBank (MH719010). Проведені дослідження створюють базис для подальшого вивчення генотипу культур, перспективних для використання у біотехнології, проводити виділення генів, які зумовлюють надзвичайну біологічну активність.

### Список використаної літератури

1. Кандыбин Н.В., Патыка Т. И., Ермолова В. П., Патыка В. Ф. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis*.: монография, Санкт-Петербург: Научное издание «Инновационный центр защиты растений», 2009, 252 с.
2. **Bravo A.**, Gomez I., Porta H. et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnol.* 2013. Vol. 6. P. 17-26.
3. Юдина Т.Г. Антимикробная активность и экологическая роль белковых включений бактерий – представителей родов *Bacillus*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*: дис...д-ра биол. наук 03.00.07: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Москва. 2006. 81 с.
4. Prakash O., Verma M., Sharma P. Polyphasic approach of bacterial classification – an overview of recent advances. *Indian J. Microbiol.* 2007. Vol. 47, № 2. P. 98-108.
5. Смирнов В. В., Резник С. Р., Сорокулова И. Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных. Киев. Наукова думка. 1983. 50 с.
6. Smirnoff W. A. A straining method for differentiating spores, crystals and cells of *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Pathol.* 1962. V.3. P. 384-386.
7. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current protocol in Mol. Biol.* 2001. P. 2.4.1-2.4.5.
8. Патыка М.В., Патыка Т.І., Григорюк І.П. Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму метагеномних нуклеотидних послідовностей ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* і прокаріотного комплексу ґрунтів. Доповіді Національної Академії Наук України. Математика. Природознавство. Технічні науки : науково - теоретичний журнал Президії НАНУ. 2012. №1. С. 164-170.
9. Tamura K., Stecher G., Peterson D., et. al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 2725-2729.

10. Keshavarzi M. Isolation, Identification and differentiation of local *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Agric. Sci. Technol.* 2008. Vol. 10. № 2. P. 43-49.

11. Goto K., Omura T., Hara Y., Sadaie Y. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2000. 46. P. 11-18.

### Список використаної літератури у транслітерації / References

1. Kandibyn N. V., Patika T. Y., Ermolova V. P., Patika V. F. (2009) Mykrobyokontrol chyslennosti nasekomikh y eho domynanta *Bacillus thuringiensis*. [Microbiological of insects and its dominant *Bacillus thuringiensis*] Sankt-Peterburh: Nauchnoe yzdanye «Ynnovatsyonnii tsentr zashchyti rastenyi». [in Ukrainian].

2. Bravo A., Gomez I., Porta H. et al. (2013) Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnol.* Vols. 6, 17-26. [in Ukrainian].

3. Yudina T.G. (2006) Antimikrobnaya aktivnost i ekologicheskaya rol belkovyih vklyucheniya bakteriy – predstaviteley rodov *Bacillus* [Antimicrobial activity and ecological role of protein inclusions of bacteria - representatives of *Bacillus* genera]. Moskva. [in Russian].

4. Prakash O., Verma M., Sharma P. (2007). Polyphasic approach of bacterial classification – an overview of recent advances. *Indian J. Microbiol.* Vols. 47. 2, 98-100. (In India).

5. Smirnov V. V., Reznik S. R., Sorokulova I. B. (1983) Metodicheskie rekomendatsii po vyideleniyu i identifikatsii bakteriy roda *Bacillus* iz organizma cheloveka i zhivotnyih. Kiev [Guidelines for the isolation and identification of bacteria of the genus *Bacillus* from the human body and animals]. Kyiv: Naukova dumka. [in Ukrainian].

6. Smirnoff W. A. A (1962) straining method for differentiating spores, crystals and cells of *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Pathol.* Vols 3, 384-386. [in United States].

7. Wilson K. (2001) Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current protocol in Mol. Biol.* 2.4.1-2.4.5. [in United States].

8. Patyka M.V., Patyka T.I., Grygoryuk I.P. (2012) Molekulyarno-genetychnyj analiz polimorfizmu metagenomnykh nukleotydnykh poslidovnostej entomopatogenykh bakterij *Bacillus thuringiensis* i prokariotnogo kompleksu gruntiv. Dopovidi Nacionalnoyi Akademiyi Nauk Ukrayiny. Texnichni nauky: naukovo - teoretychnyj zhurnal Prezydiyi NANU – *Scientific and Theoretical Journal of the Presidium of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 1, 164-170. [in Ukrainian].

9. Tamura K., Stecher G., Peterson D., et. al. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* Vols. 30. 2725-2729. [in United States].

10. Keshavarzi M. (2008) Isolation, Identification and differentiation of local *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Agric. Sci. Technol.* Vols. 10. 2. 43-49 [in Iran].

11. Goto K., Omura T., Hara Y., Sadaie Y. (2000) Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vols. 46. 11-18. [in Japan].

**АННОТАЦИЯ**  
**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ**  
**ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ШТАММА *BACILLUS THURINGIENSIS* 87/3**

Проведен сравнительный анализ основных физиолого-биохимических свойств штамма энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* (Bt)87/3 с аналогичными свойствами референтного штамма Bt 800. Установлено, что по совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств, в частности расщепления крахмала и эскулина, образования каталазы, АМК, разрежения желатины штамм принадлежит к группе *B.thuringiensis*. Осуществлён молекулярно-биологический анализ штамма Bt 87/3, основанный на изучении полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. На основании анализа нуклеотидной последовательности 16S рРНК построена дендрограмма филогенетических связей между разными представителями бактерий рода *Bacillus*. Сиквенс 16S рРНК штамма зарегистрирован и внесен в базу GenBank (MH719010). Проведенные исследования создают базис для дальнейшего изучения генотипа культур, перспективных для использования в биотехнологии.

**Ключевые слова:** *Bacillus thuringiensis*, культурально-морфологические признаки, физиолого-биохимические свойства, внутривидовая гетерогенность, молекулярно-биологический анализ, идентификация.

**Рис. 1. Лит.11.**

**ANNOTATION**  
**MOLECULAR-BIOLOGICAL PROPERTIES OF ENTOMOPATHOGENIC**  
**STRAIN *BACILLUS THURINGIENSIS* 87/3**

The comparative analysis of the main physiological and biochemical properties of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) 87/3 strain with similar properties of the Bt 800 reference strain has been carried out. It has been observed that in terms of cultural, morphological, physiological and biochemical properties, in particular the breakdown of starch and esculin, the formation of catalase, AMC, the liquefaction of gelatin, strain belongs to the *B.thuringiensis* group. The molecular-biological analysis of the Bt 87/3 strain was carried out, based on the study of the 16S rRNA nucleotide sequences genes polymorphism. Based on the analysis of the 16S rRNA nucleotide sequence, a dendrogram of phylogenetic connections between different representatives of the bacteria genus *Bacillus* was constructed. The 16S rRNA strain sequence was registered and entered into the GenBank database (MH719010). The conducted research creates a basis for the further genotype culture studying that are perspective to use in biotechnology.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, cultural-morphological characteristics, physiological-biochemical properties, intraspecific heterogeneity, molecular biological analysis, identification.

**Fig. 1. Lit. 11.**



### Інформація про авторів

**Бойко Марія Вікторівна** – аспірант кафедри екобіотехнології та біорізноманіття, Національний університет біоресурсів і природокористування України (03041, м. Київ, вул. Героїв оборони, 13 e-mail: maryaulina@gmail.com).

**Патика Тетяна Іванівна** – доктор сільськогосподарських наук, директор НДІ фітомедицини, біотехнологій та екології, старший науковий співробітник кафедри фітопатології, Національний університет біоресурсів і природокористування України (03041, м. Київ, вул. Героїв оборони, 13 e-mail: patykatatyana@gmail.com).

**Патика Микола Володимирович** – доктор сільськогосподарських наук, член-кореспондент НААН України, завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття, Національний університет біоресурсів і природокористування України (03041, м. Київ, вул. Героїв оборони, 13 e-mail: ecobio.chair@gmail.com).

**Бойко Марія Вікторівна** – аспірант кафедри екобіотехнології та біорізноманіття, Національний університет біоресурсів і природокористування України (03041, г. Киев, ул. Героев обороны, 13 e-mail: maryaulina@gmail.com).

**Патика Татьяна Ивановна** – доктор сельскохозяйственных наук, директор НИИ фитомедицины, биотехнологий и экологии, старший научный сотрудник кафедры фитопатологии, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины (03041, г. Киев, ул. Героев обороны, 13 e-mail: patykatatyana@gmail.com).

**Патика Николай Владимирович** – доктор сельскохозяйственных наук, член-кореспондент НААН Украины, заведующий кафедрой экобиотехнологии и биоразнообразия, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины (03041, г. Киев, ул. Героев обороны, 13 e-mail: ecobio.chair@gmail.com).

**Boyko Mariya Victorivna** – post-graduate student of the Department of Ecobiotechnology and Biodiversity, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine (03041, Kyiv, Heroes of Defense Str., 13 e-mail: maryaulina@gmail.com).

**Patyka Tatyana Ivanivna** – Doctor of Agricultural Sciences, Director of the Institute of Phytomedicine, Biotechnology and Ecology, Senior Researcher of the Department of Phytopathology, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine (03041, Kyiv, Heroes of Defense Str., 13 e-mail: patykatatyana@gmail.com).

**Patyka Nikolay Vladimirovich** – Doctor of Agricultural Sciences, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, Head of the Department of Ecobiotechnology and Biodiversity, National University of Bioresources and Nature Management of Ukraine (03041, Kiev, Heroes of Defense, 13, e-mail: ecobio.chair@gmail.com).