УДК 579.222.3:579.264:579.252.2
DOI: https://www.doi.org/10.18524/978-617-689-454-4.4

РОЗДІЛ 4. АЕРОБНІ СПОРОТВІРНІ БАКТЕРІЇ ГЛИБОКОВОДНИХ ОСАДІВ ЧОРНОГО МОРЯ

Штеніков М.Д., Васильєва Н.Ю., Іваниця В.О.

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

Анотація

З глибоководних відкладень Чорного моря виділено ізоляти споротвірних бактерій, які методом аналізу профілів жирних кислот віднесено до 14 видів родів *Bacillus, Paenibacillus* та *Brevibacillus.* Виділені бактерії охарактеризовані за антагоністичною активністю по відношенню до опортуністичних патогенів людини. За результатами скринінгу було відібрано *Bacillus velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559. Загальні характеристики геномів цих бактерій укладаються в діапазон значень, властивий відповідним видам. Методом рідинної хромато-масспектрометрії у бактерій штаму *Bacillus velezensis* ONU 553 виявлено та ідентифіковано 90, *B. pumilus* ONU 554 – 33, *B. subtilis* ONU 559 - 43 екзометаболіти. Серед них виявлено антибіотики класів ліпопептидів та амікумацинів, а також пентапептид GPFPI. Виявлені сполуки, які ідентифіковані для бацил вперше, потребують подальшої верифікації. Для ряду сполук вперше ідентифіковано біосинтетичні генні кластери. Розраховані за профілями жирних кислот індекси термофільності та аналіз амінокислотних спектрів за методом Moura вказують на неаборигенність штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559 для донних відкладень. Виділені і вивчені штами морських бактерій поповнили Колекцію морських мікроорганізмів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, а отримані дані щодо геномів та екзометаболомів морських бактерій можуть слугувати науковою основою для розробки нових фармацевтичних препаратів.

Ключові слова: *морські бактерії, батіаль, Чорне море, Bacillus, геном, екзометаболом, антагонізм, бактеріоцини, антибіотики*

Вступ

Екологія споротвірних бактерій у морському середовищі взагалі та морських донних відкладеннях зокрема залишається маловивченим питанням. Систематична наукова робота в даному напрямку розпочалася відносно недавно, і зроблено в ньому значно менше, у порівнянні із ступенем вивченості мікробіоти ґрунту. Зокрема, загадковими залишаються питання про їх таксономічний склад та закономірності варіювання між мікробіотопами [70, 76, 85, 87, 88].

Зокрема, протягом багатьох років дослідження морських споротвірних бактерій буксували через такий, що важко усувається, систематичний дефект у метагеномних даних, а саме неможливість селективно отримати ДНК з вегетативних клітин та ендоспор (виділення ДНК з ендоспор традиційними методами неможливо) [137]. Ця проблема була вирішена технічно лише у 2013 році. З використанням цього методу для аналізу з'ясувалося, що частка ендоспор серед морських споротвірних бактерій вища за долю вегетативних клітин, тобто в цілому відтворюється ситуація, відома на суходолі – бацили вірні своєму зимогенному способу життя.

Крім того, частка фірмікут взагалі і тим більше споротвірних бактерій у мікробних спільнотах різноманітних біотопів моря рідко перевищує 30%, не сягаючи таких значень, як на суходолі; переважна частина фірмікут в донних відкладеннях представлена видами класу Clostridia [46, 47, 68, 82]. Це легко можна пояснити відносно низькою адаптивною перевагою здатності до спороутворення у морському середовищі у порівнянні суходолом, особливо ґрунтами – основним місцем мешкання аеробних споротвірних бактерій. Дане міркування підтримується рядом фактів. Так, серед представників родини *Bacillaceae* відомо кілька родів, що втратили здатність до утворення ендоспор – і це саме морські роди (наприклад, *Marinococcus*) [131]. Також серед морських представників близьких до споротвірних бактерій за всіма іншими ознаками відомо багато штамів з обмеженим або взагалі незареєстрованим спороутворенням [57, 104].

Дані факти роблять актуальним питання про автохтонність споротвірних бактерій для морського середовища. Дуже ймовір-

ним, на перший погляд, є припущення про те, що аеробні споротвірні бактерії є цілком суходільною групою і для морських біотопів є лише компонентами алохтонної біоти. Проте, з початку XXI століття було описано ряд видів споротвірних бактерій різного ступеня галофільності, що виділяються з морських та таласогалинних водойм і за даними молекулярної філогенетики утворюють компактний кластер з приблизно двох десятків родів [58]. Дані організми, судячи з усього, є автохтонними саме для морського середовища. Також відомо кілька десятків видів власне роду *Bacillus*, що ізолюються виключно або переважно з моря. Дані факти свідчать про неодноразовий «вихід» споротвірних бактерій у море з наступною адаптацією до проживання в ньому. Питання про кількість таких епізодів виходу лишається відкритим, але його вивчення обіцяє дати в майбутньому багато матеріалу для дослідження явищ молекулярної конвергенції на різних рівнях структури геному.

Одним із небагатьох фактів, що були з'ясовані у відношенні аутекології, є переважання аеробних споротвірних фірмікут (на противагу протеобактеріям) у донних осадах ізольованих водойм, порівняно із відкритими, та велика кількість спорогенних паличок у донних відкладеннях пересолених глибоководних басейнів. Це досить легко пояснити насиченням донних осадів замкнених водойм матеріалом річкового виносу, що містить багато ендоспор ґрунтових споротвірних бактерій [84, 124].

Ці мікроорганізми регулярно ізолюються з різноманітних морських середовищ, але майже завжди у невеликих кількостях. Це може бути наслідком того, що базові властивості морського середовища – стабільність фізико-хімічних умов у часі та просторі, роблять надлишковим і навіть дезадаптивним головний еволюційний здобуток даної групи, який її і визначає – здатність до утворення ендоспор. Захоронені у донних відкладеннях спори без біотурбації (яка у морі значно менш активна, ніж на суходолі) приречені на тривале зберігання і зрештою – на загибель (значна частка якої є наслідком спонтанного випадкового проростання, до якого схильні ендоспори) [136] .

Окремою проблемою є з'ясування сінекологічного аспекту екології морських споротвірних бактерій. Суходольні бактерії да-

ної групи активно вступають у взаємодію з іншими видами, серед них відомі як ефективні паразити тварин, зокрема людини, рослин, так і мутуалісти, зокрема ризобактерії, що сприяють росту рослин (в англомовній літературі відомі як PGPR - plant growth promoting rhizobacteria). Знання щодо сінекології морських споротвірних бактерій, обмежуються головним чином повідомленнями про ізоляцію даних бактерій з організмів інших істот. Зокрема, морські споротвірні бактерії відомі з покривів водоростей, паренхіми губок та кишківників молюсків і голотурій, але точна їх біологічна роль лишається загадковою [65, 73, 79, 99]. Найбільш імовірним виглядає припущення про мутуалістичний характер подібних взаємовідносин, де бацили-симбіонти отримують від господаря біотоп та нутрієнти і натомість надають йому колонізаційної резистентності завдяки своїм антибіотикам широкого спектру.

Головним рушієм досліджень біосинтетичного потенціалу морських мікроорганізмів та споротвірних бактерій зокрема протягом останніх 20 років є виснаження такого потенціалу мікроорганізмів біотопів суходолу на фоні кризи антибіотикорезистентності, про яку в різних контекстах вже згадувалося вище. Зусилля в даному напрямку вже були винагороджені відкриттям нових класів сполук у представників актинобактерій [26, 35].

Біологічно активні сполуки морських споротвірних бактерій можна поділити на дві групи: такі, що доповнюють спектри сполук, представники яких вже відомі для суходільних споротвірних бактерій, та специфічні для морських штамів речовини [110]. До перших належать гагеотетрини – специфічне розширення класу сурфактинів, фенгіцин C, та макролактин W, що відповідно доповнюють родини фенгіцинів та макролактинів [145]. Описано ряд бактеріоцинів, що є представниками вже відомих на суходолі класів, зокрема лантибіотиків, циклічних бактеріоцинів, тіопептидів та гетероциклоантрацинів – підгрупи тіазолвмісних пептидів [28, 31, 43, 106]. До унікальних для морських споротвірних бактерій класів сполук належать гагеостатини, бацилітетрини та маріхізини [143]. Виходячи з великої кількості неідентифікованих біосинтетичних кластерів у даних морських метагеномів та сиквенсів індивідуальних геномів мор-

ських споротвірних бактерій, можна очікувати на значне розширення даного переліку.

Вивчення споротвірних бактерій Чорного представлено поодинокими роботами з другої половини XX сторіччя по сьогодення, головним чином за авторством турецьких та (пост)радянських авторів [72, 90]. Воно розпочалося після обнародування пропозиції Організації Об'єднаних Націй використати глибинні ділянки Чорного моря для заховання радіоактивних відходів. Уже перші роботи показали там високу чисельність та активність чорноморської мікробіоти [72]. Не дивлячись на довгу історію її вивчення, дані про бацил у літературі наводяться, якщо не рахувати роботи авторів даної монографії, головним чином для прибережних зон пелагіалі та шельфу оксигенної зони [1, 5, 7, 8, 9, 61]. Зокрема, наявні повідомлення про виявлення ґрунт-асоційованих споротвірних бактерій; інформація про виявлення саме автохтонних морських бацил в літературі відсутня [43, 141]. Фактично, найбільш добре охарактеризованим на сьогодні аспектом біології чорноморських бацил є їх протеази, що активно вивчаються українськими дослідниками [3, 4]. Серед найцікавіших результатів варто згадати відкриття у 1974 році нового виду *Clostridium durum*, який пізніше на основі комплексу фено- та генотипових ознак (зокрема, факультативної анаеробності) після складної серії перейменувань було віднесено до роду *Paenibacillus* під назвою *P. durus* [56]. Даний штам відомий головним чином через свою здатність до фіксації атмосферного азоту навіть за наявності розчинних нітратів у середовищі.

З аналізу наведеної інформації витікає, що аеробні споротвірні бактерії володіють високим біосинтетичним потенціалом, а мікробіота донних осадів Чорного моря, яка практично не вивчена, може слугувати перспективним джерелом для пошуку споротвірних бактерій-продуцентів нових антимікробних сполук.

Виходячи з викладеного вище, в цьому розділі зосереджено увагу на вивченні біологічної різноманітності та біологічних характеристик аеробних споротвірних бактерій глибоководних донних відкладень Чорного моря та визначення їх генетичного потенціалу щодо продукції антимікробних сполук для пошуку нових антибіотиків.

4.1. Методи дослідження

4.1.1. Використані штами мікроорганізмів

У роботі було використано 130 штамів споротвірних бактерій, ізольованих з проб глибоководних донних відкладень Чорного моря, відібраних з глибини до 2080 метрів в ході експедиції M84/2 Бременського університету на науково-дослідному судні METEOR: станції 233, 242, 258, 269 та 249 [22] та переданих Б. Г. Александровим з Інституту біології моря НАНУ на кафедру мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ для мікробіологічних досліджень; та зібрані науковим співробітником БННЦ ОНУ Г.В. Лісютіним на науково-дослідному судні «MARE NIGRUM» (Румунія) - станція 116 (Рис. 4.1, табл. 4.1). Кожна проба являла собою циліндричний керн морського ґрунту, який було поділено на фрагменти довжиною по 5 сантиметрів.

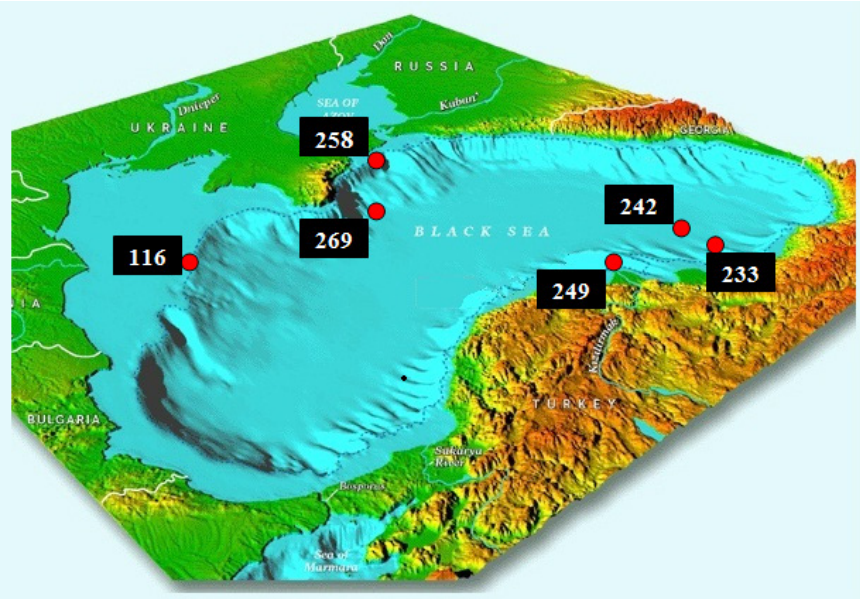

Рис. 4.1. Карта Чорного моря з позначками станцій відбору проб

Таблиця 4.1

Координати станцій відбору проб

Станція	Глибина, м	Координати	
		Широта	Довгота
249	878	N44° 37.386	E 35° 42.164
242	1499	N 41° 31.138	E 37° 37.347
233	1537	N 41° 32.670	E 37° 37.460
258	1888	N 44° 37. 243	E 35° 42.286
269	2080	N 44° 17.329	E 35° 0.081
116	183	N 44° 30.000	E 35° 05.000

Для визначення антагоністичної активності споротвірних бактерій використовували тест-штами умовно-патогенних бактерій *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.

Для виділення споротвірних бактерій та визначення їх чисельності наважку донного осаду суспендували у стерильному фізіологічному розчині у співвідношенні 1 до 10 г/л, готували десятикратні розведення в стерильному фізіологічному розчині та висівали на середовище МПА. Культивування проводили за температури 25 °С впродовж двох діб. Для виявлення аеробних споротвірних бактерій приготовлену суспензію донного осаду перед посівом на МПА прогрівали за 90 °С впродовж 10 хв.

Бактерії отриманих ізолятів забарвлювали методом Грама та мікроскопіювали з використанням бінокулярного мікроскопа Primo Star PC, Carl Zeiss з використанням імерсійної системи при збільшенні х1350. Робочі культури з виявленими спорами зберігали у пробірках на скошеному агаризованому середовищі МПА за температури 5 °С, а колекційні - за температури -84 °С в середовищі для зберігання з гліцерином.

4.1.2. Скринінг високоактивних антагоністів

Скринінг антагоністів здійснювали за методом радіальних штрихів на середовищі Гаузе-2. Як індикатори для скринінгу та для визначення антагоністичної активності фракцій після хромато-мас-спектрометрії використовували штами: *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.

4.1.3. Методи аналізу спектрів жирних кислот

Культивування досліджуваних штамів, виділення та хроматографічне розділення метилових ефірів жирних кислот проводили згідно MIS Operating Manual [33, 103, 108]. Для аналізу жирних кислот бактерії вирощували на середовищі Triptic soy agar (Merck, Germany) при 28±1 °C впродовж 24 год. Підготовку проб та хроматографічне розділення метилових ефірів жирних кислот здійснювали згідно стандартного протоколу. Першим етапом був лізис клітин з наступним омиленням ліпідів мікроорганізмів. Омилення проводили з додаванням суміші (1мл 1,125 М розчину NaOH у метанолі) при температурі 95-100 °C впродовж 30 хв. Подальше метилування жирних кислот здійснювали з додаванням розчину кислого метанолу (2 мл 6,0 N HCl у метанолі) при 80 ^{o}C впродовж 10 хв. Екстраговані метилові ефіри жирних кислот нейтралізували 0,3 М розчином NaOH [108].

Визначення ЖК-спектрів виконували методом газової хроматографії з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум’яно-іонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США), колонка капілярна ULTRA 2 (25 м х 0,2 мм х 0,33 мкм), детектор полум’яно-іонізаційний. Пробу (2 мкл) вводили в режимі split з коефіцієнтом 40:1, температура випаровувача 250 °C. Розділення проводили в режимі програмування температури - початкова температура 170 °C з наступним градієнтом 5 °C/хв до 270 °C. Вміст жирних кислот виражали у відсотках до

загальної суми площ піків. Для ідентифікації досліджуваних штамів використовували бібліотеку RSTBA6 6.2 [108].

Інтерпретацію даних системи Midi Sherlock виконували за значенням найвищого sim-індексу з запропонованих системою для кожного штаму, за виключенням випадків, коли sim-індекс був занадто низьким (<0,300); в такому випадку штам вважався як вид, який не визначено.

Підрахунок Heat Adaptation Index виконували за формулою [40]:

$$\mathrm{HAI} = \frac{(n14{:}\,0) + p(n16{:}\,0) + p(i14{:}\,0) + p(i15{:}\,0) + p(i16{:}\,0) + p(i17{:}\,0)}{p(a15{:}\,0) + p(a17{:}\,0) + p(n16{:}\,1) + p\big(i17{:}\,1(n-10)\big) + p(16{:}\,1\omega 7\mathrm{calcohol})}$$

де p є часткою певної жирної кислоти.

За допомогою онлайн-інструменту за адресою https://www.alyoung.com/ розраховували індекс Сімпсона для біологічної різноманітності споротвірних бактерій донних відкладень.

4.1.4. Визначення фізіолого-біохімічних властивостей бактерій

Тести на утилізацію гліцеролу, ерітрітолу, D-арабінози, L-арабінози, D-рібози, D-ксилози, L-ксилози, D-адонітолу, Метил-βd-ксілопіранозиду, D-галактози, D-глюкози, D-фруктози, D-маннози, L-сорбози, L-Рамнози, дульцитолу, інозитолу, D-манітолу, D-сорбітолу, метил-αd-маннопіранозиду, метил-αd-глюкопіранозиду, N-ацетилглюкозаміну, амігдаліну, арбутіну, ескулін цитрату феруму, саліцину, D-целобіози, D-мальтози, D-лактози, D-мелібіози, D-цукрози, D-трегалози, інуліну, D-меліцитози, D-рафінози, амілодекстрину, глікогену, ксилітолу, гентиобіози, D-туранози, D-ліксози, D-тагатози, D-фукози, L-фукози, D-арабітолу, L-арабітолу, натрію глюконату, натрію 2-кетоглюконату та натрію 3-кетоглюконату здійснювали з використанням тест-системи API 50CH (bioMérieux, Inc., Marcy l'Etoile, France), згідно з рекомендаціями виробника [102].

Визначення чутливості до антибіотиків еритроміцину, олеандоміцину, ріфампіцину, ампіциліну, тетрацикліну, стрептоміцину, нетілміцину, бензилпеніциліну, канаміцину, оксициліну, цефазоліну, левоміцетину, левофлоксацину, азитроміцину, цефо-

перазону, лінкоміцину, цефалексину, цефіксиму та фурагіну виконували за допомогою тесту Байера-Кірбі на середовищі МПА [2].

4.1.5. Аналіз спектрів моносахаридів

Для визначення загального складу моноцукрів до зразку бактеріальної біомаси об'ємом у дві бактеріологічні петлі додавали 2 мл 2М трифтороцтової кислоти [55]. Гідроліз проводили при 100 °С впродовж 6 год. Гідролізат упарювали, промивали водою для видалення кислоти. Для отримання альдонітрильних похідних моносахаридів до екстракту додавали дериватизуючу суміш (гідроксиламін солянокислий у метанолі). Розчинений екстракт витримували впродовж 25 хв при 75 °С. Після ацетилювання до реакційної суміші додавали 1 мл дихлорметану. Дихлорметановий шар відбирали, висушували та розчиняли в 300 мкл суміші гептан/етилацетат (1:1 о/о).

Моносахариди визначали методом газо-рідинної хромато-мас-спектрометрії на системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent technologies, USA), колонка капілярна HP-5ms (30м×0,25мм ×0,25мкм). Температура випаровувача 250 °С, температура інтерфейсу 280 °С. Розділення проводили в режимі програмування температури - початкову температуру 160 °С витримували впродовж 8 хв, піднімали з градієнтом 5 °С/хв до 240 °С. Кінцеву температуру витримували впродовж 6 хв. Пробу об'ємом 1 мкл, вводили в режимі поділу потоку 1:50. Детектування проводили в режимі SCAN в діапазоні (38-400 m/z). Швидкість потоку газу носія через колонку 1,2 мл/хв. Ідентифікацію проводили за часом утримання стандартів моносахаридів та з використання бібліотеки мас-спектрів NIST 02. Кількісний аналіз проводили шляхом додавання розчину внутрішнього стандарту в досліджувані проби. В якості внутрішнього стандарту використовували розчин сорбітолу.

4.1.6. Аналіз спектрів амінокислот

Для визначення загальної кількості амінокислот дві бактеріологічні петлі бактеріальної біомаси поміщали до віали, додавали 2 мл водного розчину 6N соляної кислоти та поміщали в термостат при 110 °С [62]. Гідроліз проводили впродовж 24 год.

Після чого 0,5 мл відцентрифугованого екстракту/гідролізату упарювали на роторному випаровувачі, тричі промиваючи дистильованою водою для видалення соляної кислоти. Ресуспендували в 0,5 мл дистильованої води та фільтрували крізь мембранні фільтри з регенерованої целюлози з порами 0,2 мкм. Отримання флуоресцентних похідних проводили в автоматичному програмованому режимі перед введенням проби в хроматографічну колонку з використанням OPA (orthophthalaldehyde) та FMOC (9-fluorenylmethylchloroformate). Амінокислоти визначали методом газо-рідинної хромато-мас-спектрометрії на системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent technologies, USA), колонка капілярна HP-5ms (30м×0,25мм×0,25мкм). Ідентифікацію амінокислот проводили шляхом порівняння часу утримання з стандартною сумішшю амінокислот (Agilent 5061-3334). Кількісна оцінка рангової кореляції між рядами спадання вмісту для амінокислот була виконана з використанням тесту Кендела, реалізованого в бібліотеці ScyPy мови програмування Python [12, 132].

4.1.7. Аналіз спектрів екзометаболітів

Визначення спектру екзометаболітів виконували за методом [98], для цього бактерії вирощували в триптоно-соєвому бульйоні (Sigma-Aldrich) та середовищі М наступного складу: соєва мука – 20 г/л, картопляний крохмаль – 3 г/л, екстракт дріжджів – 1 г/л, $(NH4)_2SO_4$ – 1 г/л, $MgSO_4$ – 1 г/л, KH_2PO_4 – 0,6 г/л, pH 7,0 протягом 7 діб на шейкері за температури 28 °C за частоти обертання 180 об/хв. Екзометаболіти з культуральної рідини досліджуваних штамів екстрагували етилацетатом та бутанолом у співвідношенні 1:1, упарювали досуха та розчиняли в метанолі для подальших маніпуляцій. Отримані загальні екстракти фракціонували методом колонкової гель-фільтраційної хроматографії з використанням колонки довжиною 1 м, заповнені LH 20 Sephadex (Sigma-Aldrich). Елюцію здійснювали метанолом в якості рухомої фази за швидкості потоку один мл/хв. Фракції збирали кожні 15 хв, концентрували шляхом випаровування та розчиняли в 0,5 мл метанолу.

Компонентний склад загальних екстрактів та їх активних фракцій аналізували методом рідинної хромато-мас-спектрометрії

високої роздільної здатності на рідинному хромато-мас-спектрометрі amaZone (Brucker, Daltonics), колонка BEH C18 50×2.1 мм, 1.7мкм (Waters, Germany), рухома фаза А – вода з 0,1% мурашиної кислоти та В – ацетонітрил з 0,1% мурашиної кислоти. Використовували лінійний градієнт від 5 до 95% впродовж 9 хв. Кожна отримана фракція була протестована на предмет антимікробної активності.

4.1.8. Методи виділення та секвенування геномної ДНК

Виділення ДНК здійснювали за модифікованим методом [36]. Для очищення виділеної загальноклітинної ДНК від домішок РНК до ресуспендованої проби додавали 20 мкл попередньо активованої РНКази з концентрацією 5 мкг/мл. Проби витримували при 37 ^{o}C впродовж 3-4 год, суміш повільно перемішували з інтервалами в 30 хв. Аналіз якості та чистоти виділеної ДНК проводили на нанодропі Denovix DS-11FX+ та з використанням горизонтального електрофореза в 1,5% агарозному гелі при постійній напрузі в 150 В впродовж 40 хв. Всі використані реагенти були від Sigma, ферменти – від New England Biolabs. Секвенування ДНК було виконано в Інституті фармацевтичних досліджень Гельмгольца землі Саар. Отриману геномну ДНК секвеновано з використанням двох бібліотек з короткою та довгою вставкою на приладі HiSeq 1500 (Illumina).

4.1.9. Збірка та аналіз загальних характеристик геномів

Збірка рідів *de novo* виконана з використання асемблеру Newbler (версія 2.8, Roche). Для визначення виду на основі даних гену 16S рРНК та повногеномного порівняння використовували інструмент TYGS [86], пошук секреторних сигналів у первинній структурі обраних протеїнів - Signal IP [14]. Обрахування OrthoANI виконували за допомогою Ezbiocloud [139] та програми OAT [74]; для обрахування GGDC застосували також програми OAT. Анотування геному виконували за допомогою серверів PATRIC [133] та NCBIPGAP [126], порівняльний аналіз - SEED [96] та BEACON [64].

Пошук та аналіз кластерів біосинтетичних генів здійснили за допомогою antiSMASH [21], PRISM 3 [116], Bagel4 [129] та

BiG-SCAPE [92]. Пошук детермінант патогенності виконували за допомогою IslandViewer [20] та VirulenceFinder 2.0 [63], для пошуку детермінант резистентності використано ResFinder [142], профагових елементів – FASTER [15], Phigaro [120] та PhageWeb [119]. Реконструкцію метаболітів за даними конкретного кластеру виконували для всіх кластерів, окрім трансАТ-ПКС, за допомогою PRISM 3 [116], а для кластерів трансАТ-ПКС - з використанням TransATor [59]. Експериментально верифіковані референтні генетичні кластери були взяті з бази даних MiBIG [67]. Візуалізацію гомології для біосинтетичних кластерів здійснили за допомогою Easyfig [121] та Mauve [34]. За результатами PATRIC будували карту геному засобами цього сервера.

4.2. Мікробіота глибоководних донних відкладень Чорного моря

4.2.1. Чисельність спороутворювальних бактерій

Проведені дослідження виявили складний характер залежності чисельності мезофільних і психрофільних бактерій та ендоспор в їх популяціях від рівня горизонту та географічних точок відбору зразків донних відкладень.

Загальне мікробне число (ЗМЧ) та кількість ендоспор демонструють різні картини розподілу по горизонтах (табл. 4.2, 4.3). Так, ЗМЧ як психрофілів так і мезофілів приблизно лінійно ростуть з глибиною, що суперечить усталеним знанням про вертикальний розподіл мікроорганізмів у донних відкладеннях морських водойм. На станції 242 виявлено два піки чисельності мезофілів, пояснити які важко через відсутність у наданих нам даних експедиції Бременського університету щодо геологічної структури керну з цієї станції (рис. 4.2). Висока концентрація мезофілів також відмічена на станції 258, горизонті 30-35, що складається з карбонату як цементуючого компоненту, а не вкраплень. Пік цих бактерій на горизонті 45-50 станції 269 (10^7 КУО/г) розташований у зразку в прошарку сапропелю. Відомо, що сапропель через свою насиченість слабко окисненими сполуками вуглецю має високу концентрацію мікроорганізмів до 10^7 КУО/г [123], а в нашому випадку цей показник перевищено на порядок.

Динаміка вмісту психрофілів дещо співпадає з відміченими тенденціями для мезофілів, хоча відсутній пік на станції 242 у горизонті 25-30, натомість виражений на горизонті 20-25 (рис. 4.3).

Вміст ендоспор психрофілів, в то же час, демонструє щось на зразок параболічної залежності від глибини горизонту, хоча на глибинах біля 50 см їх концентрації також значно вищі за поверхневі (рис. 4.5). Концентрація ендоспор мезофілів натомість мало залежить від глибини та станції, помітні лише кілька піків на станціях 242 та 269 (горизонт 20-25 см), 258 (35-40 см) та 269, горизонт 45-50 см (рис. 4.4). Ці максимуми вже відповідають чисельності мезофілів без урахування здатності до утворення ендоспор. Динаміка концентрації ендоспор психрофілів важко піддається поясненню. Можливо, це свідчить про наявність у чорноморських донних відкладеннях значної популяції автохтонних ендспороутворювальних бактерій.

Інтерпретація отриманих даних з точки зору характеру мікробіоти різних типів відкладень та геологічної історії седіментогенезу потребує певної обережності з ряду причин. Самі керни мають тонку шарувату структуру, але потужність окремих шарів (глина, піщані відкладення, кокколіти, сапропель) сягає лише кількох міліметрів, в той час як відбір проб проводився кожні 5 см. Крім того, за спостереженнями учасників німецької експедиції, гази, що вділялися з донних відкладень, часто порушували природню шаруватість, що також додає певної умовності отриманим результатам.

Отримані результати цілком підтверджують відоме спостереження щодо переважання аспорогенних форм над спорогенними у морських донних відкладеннях [45,107]. Відношення ЗМЧ мезофілів та психрофілів до вмісту ендоспор відповідних фізіологічних груп мало залежать від горизонту практично на всіх станціях та тримаються на рівні 20 (рис. 4.6 та 4.7).

Окремі випадки перевищення цього показника характерні для горизонту 25-35 см станції 258, де наявний потужний шар глини. Цей ефект спостерігається як для психрофілів, так і мезофілів. Це супроводжується відносно низькою концентрацією ендоспор у даних пробах. Можна припустити, що ця глина була нанесена з річковим стоком під час розмиву певних масивів глини

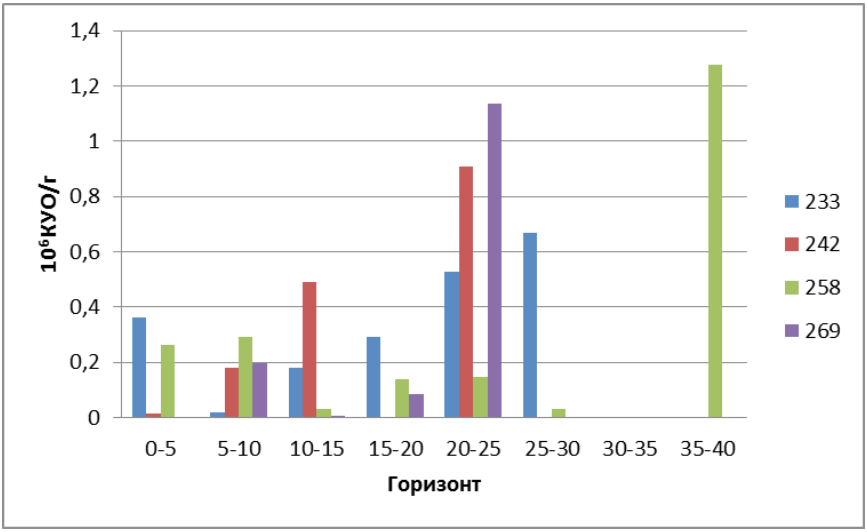

Рис. 4.2. Вміст вегетативних клітин мезофілів на різних горизонтах осадів

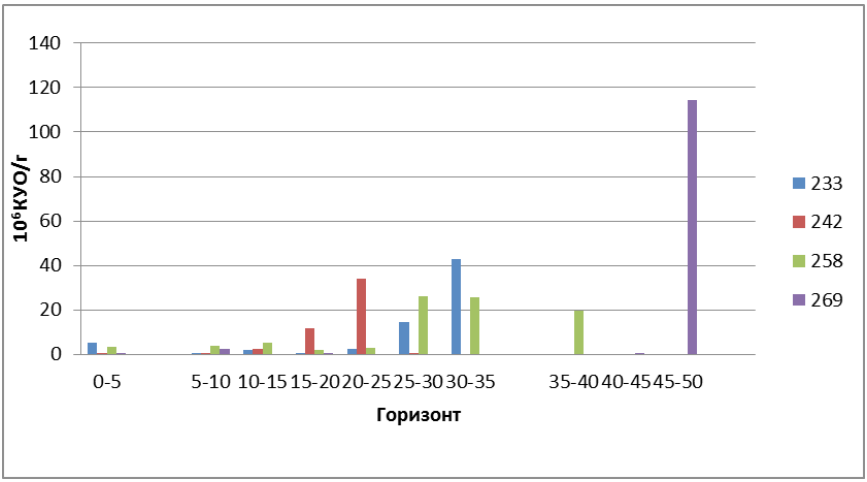

Рис. 4.3. Вміст вегетативних клітин психрофілів на різних горизонтах осадів

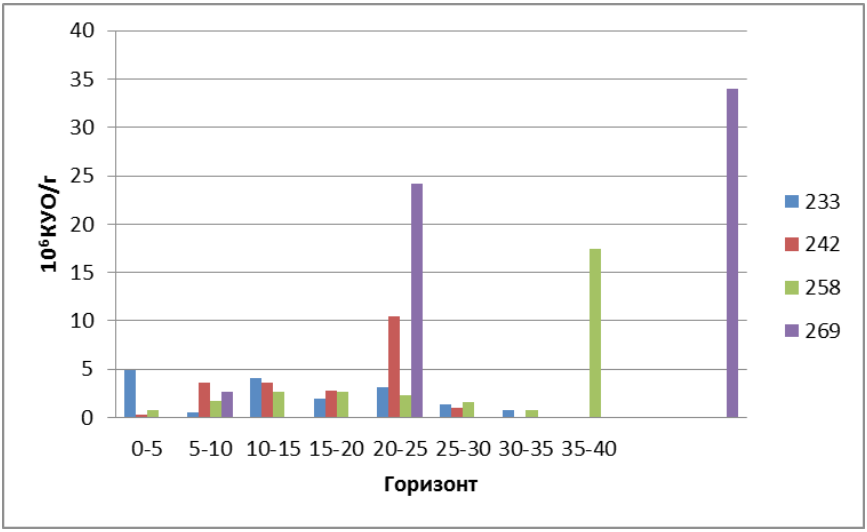

Рис. 4.4. Вміст ендоспор мезофілів на різних горизонтах осадів

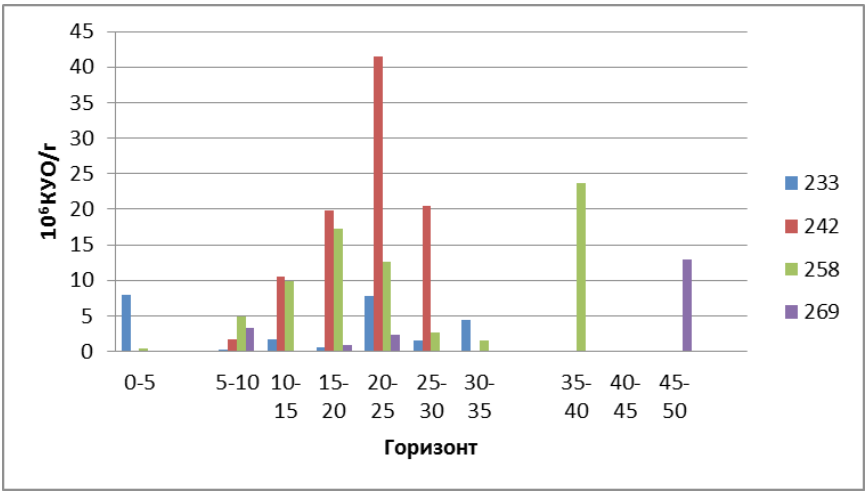

Рис. 4.5. Вміст ендоспор психрофілів на різних горизонтах осадів

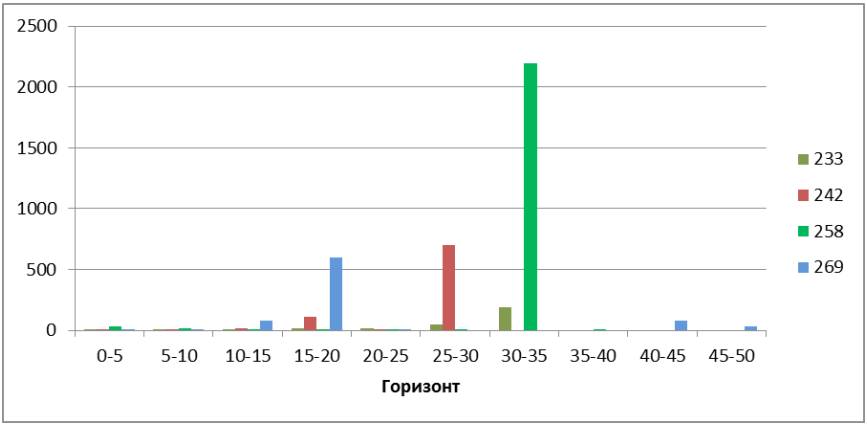

Рис. 4.6. Співвідношення ЗМЧ мезофілів та вмісту ендоспор мезофілів

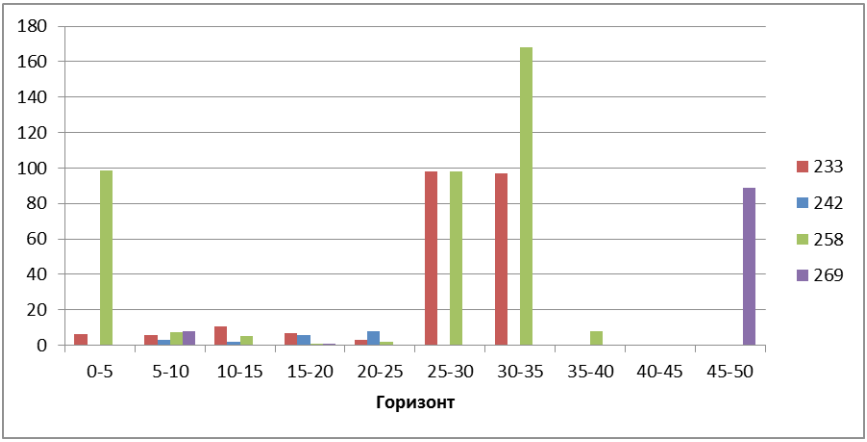

Рис. 4.7. Відношення ЗМЧ психрофілів до вмісту ендоспор психрофілів

Таблиця 4.2

Чисельність ендоспор мезофільних бактерій у донних відкладеннях Чорного моря

Горизонт, см	Станція 233		Станція 242		Станція 258		Станція 269	
	ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори
0-5	$3,64\times10^{5}\pm6158$	$4,97\times10^{4}\pm322$	$1,58\times10^{4}\pm249$	$3,58\times10^{3}\pm12$	$2,65\times10^{5}\pm840$	$7,84\times10^{3}\pm67$	$1,4\times10^{2}\pm4$	$6\times10^{1}\pm3$
5-10	$1,86\times10^{4}\pm38$	$4,94\times10^{3}\pm39$	$1,8\times10^{5}\pm1067$	$3,57\times10^{4}\pm95$	$2,93\times10^{5}\pm2704$	$1,76\times10^{4}\pm72$	$1,96\times10^{5}\pm7$	$2,64\times10^{4}\pm51$
10-15	$1,82\times10^{5}\pm2407$	$4,06\times10^{4}\pm284$	$4,9\times10^{5}\pm5335$	$3,6\times10^{4}\pm135$	$3,11\times10^{4}\pm96$	$2,61\times10^{4}\pm95$	$8\times10^{4}\pm234$	$1\times10^{2}\pm3$
15-20	$2,92\times10^{5}\pm2202$	$2\times10^{4}\pm165$	$3,13\times10^{7}\pm149422$	$2,73\times10^{4}\pm65$	$1,4\times10^{5}\pm1082$	$2,64\times10^{4}\pm75$	$8,4\times10^{4}\pm3409$	$1,4\times10^{2}\pm3$
20-25	$5,28\times10^{5}\pm4667$	$3,13\times10^{4}\pm308$	$9,1\times10^{5}\pm3485$	$1,04\times10^{5}\pm551$	$1,46\times10^{5}\pm884$	$2,27\times10^{4}\pm122$	$1,13\times10^{6}\pm8562$	$2,42\times10^{5}\pm922$
25-30	$6,68\times10^{5}\pm7137$	$1,39\times10^{4}\pm81$	$7,16\times10^{6}\pm83727$	$1,02\times10^{4}\pm51$	$3,27\times10^{4}\pm200$	$1,58\times10^{4}\pm93$	0	0
30-35	$1,40\times10^{6}\pm10083$	$7,38\times10^{3}\pm33$	#	#	$1,77\times10^{7}\pm77439$	$8,06\times10^{3}\pm71$	#	#
35-40	#	#	#	#	$1,28\times10^{6}\pm23023$	$1,74\times10^{5}\pm1222$	#	#
40-45	#	#	#	#	#	#	$2\times10^{4}\pm524$	$2,6\times10^{2}\pm3$
45-50	#	#	#	#	#	#	$1,14\times10^{7}\pm153513$	$3,4\times10^{5}\pm890$

- проби з цього горизонту відсутні

Таблиця 4.3

Чисельність ендоспор психротолерантних бактерій у донних відкладеннях Чорного моря

Горизонт	Станція 233		Станція 242		Станція 258		Станція 269	
	ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори	ЗМЧ	Ендоспори
0-5	$5\times10^5\pm7315,5$	$7,88\times10^4\pm659,3$	$4,6\times10^2\pm18$	0	$3,41\times10^5\pm1351$	$3,45\times10^3\pm62$	$2\times10^1\pm1$	$6\times10^2\pm2$
5-10	$1,64\times10^4\pm53$	$2,9\times10^3\pm13$	$5,4\times10^4\pm983$	$1,69\times10^4\pm79$	$3,58\times10^5\pm1395$	$4,86\times10^4\pm284$	$2,6\times10^5\pm2030$	$3,24\times10^4\pm114$
10-15	$1,82\times10^5\pm2407$	$1,68\times10^4\pm58$	$2,22\times10^5\pm2670$	$1,05\times10^5\pm842$	$5,02\times10^5\pm2642$	$9,8\times10^4\pm585$	0	0
15-20	$4,4\times10^4\pm425$	$6,28\times10^3\pm20$	$1,14\times10^6\pm8175$	$1,98\times10^5\pm1817$	$1,83\times10^5\pm684$	$1,72\times10^5\pm448$	$7,5\times10^3\pm420,6$	$8,88\times10^3\pm76,1$
20-25	$2,48\times10^5\pm2238$	$7,83\times10^4\pm860$	$3,39\times10^6\pm8540$	$4,15\times10^5\pm1700$	$2,87\times10^5\pm701$	$1,26\times10^5\pm1478$	0	$2,36\times10^4\pm16,4$
25-30	$1,44\times10^6\pm6087$	$1,47\times10^4\pm325$	$1,02\times10^4\pm51$	$2,05\times10^5\pm685$	$2,61\times10^6\pm9339$	$2,67\times10^4\pm89$	0	0
30-35	$4,27\times10^6\pm$ 21655,5	$4,4\times10^4\pm$ 490,5	#	#	$2,55\times10^6\pm8835$	$1,51\times10^4\pm86$	#	#
35-40	#	#	#	#	$1,94\times10^6\pm5892$	$2,36\times10^5\pm830$	#	#
40-45	#	#	#	#	#	#	$4\times10^3\pm250$	0
45-50	#	#	#	#	#	#	$1,14\times10^7\pm$ 122459	$1,29\times10^5\pm$ 2821

- проби з цього горизонту відсутні

і тому вони, на відміну від ґрунтових виносів, збіднені на ендоспори.

Цей показник для психрофілів демонструє схожу картину – нечисленні пікові значення на рівномірному фоні, частина піків збігається з такими для мезофілів, але в цілому їх більше. Видимий «сапропельний» пік на станції 269 (горизонт 45-50) та пік на станції 258 (горизонт 0-5 см) – співпадають з зоною кокколітового мулу, який на цьому горизонті властивий усім пробам.

Отримані результати загальної чисельності гетеротрофних бактерій узгоджуються з даними інших авторів. Відомо, що чисельність бацил у відносно замкнутих водоймах і гіпооксигенних водах вище, ніж у відкритих оксигенних [101]. Ймовірно, виявлений розподіл мікробіоти донних відкладень моря відповідає цій залежності [9,107].

Для пояснення встановлених фактів, які носять ймовірно стохастичний характер, необхідно провести масштабні дослідження мікроорганізмів різних таксономічних груп з різних районів моря та провести їх ідентифікацію, з підключенням метагеномних досліджень. Тільки детальне з'ясування структури мікробіоти донних відкладень у співставленні їх з гідрологічними, гідрохімічними та кліматичними умовами в часовому вимірі дасть можливість певною мірою впевнено судити про характер та причини зміни її чисельності з глибиною та координатами станції.

Інформації щодо розподілу мікробного населення донних відкладень дуже мало, а щодо Чорного моря взагалі відсутня у вільному доступі. Це може бути пов’язано активним вивченням мікробіоти глибоко захоронених донних відкладень (нижче метра від поверхні дна). Проте в поодиноких дослідженнях виявлена крива залежності вмісту бактерій від глибини в осадах, подібна отриманій в нашій роботі [32, 52].

4.2.2. Видова різноманітність споротвірних бактерій

Ідентифікацію ізольованих гетеротрофних споротвірних бактерій здійснювали методом хемотаксономії з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США) шляхом порівняння спектрів жирних кислот з наявними спектрами в автоматичній системі.

Виявлено, що різноманітність досліджуваних бактерій донних відкладень описується класичним розподілом: є менша кількість більш чисельних видів та велика кількість менш чисельних видів. Індекс Сімпсона виявися рівним 0,1, що свідчить про низьке біологічне різноманіття даного угрупування.

Таблиця 4.4

Видова різноманітність досліджуваних споротвірних бактерій

Вид	Частка, %
Bacillus megaterium GC subgroup A	17,91
Bacillus subtilis	14,18
Brevibacillus reuszeri	14,18
Bacillus viscosus	11,94
Bacillus licheniformis	8,96
Bacillus megaterium GC subgroup B	5,22
Bacillus sp. GC group 22	4,48
Bacillus atrophaeus	3,73
Bacillus pumilus GC subgroup A	3,73
Bacillus luciferensis	2,24
Bacillus halmapalus	1,49
Paenibacillus larvae	0,75
Bacillus cereus GC subgroup A	0,75
Brevibacillus choshinensis	0,75
Bacillus oleronius	0,75
Lysinibacillus sphaericus GC subgroup B	0,75
Невизначені штами	8,46
Разом	100

Близько 45% усіх ізольованих та ідентифікованих штамів належать до трьох видів – *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* та *Brevibacillus reuszeri* (табл. 4.4). Всі ці види звичайно виділяються з ґрунту та є аеробними [37, 53]. З трійки видів споротвірних бактерій, до якої входять *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, що звичайно домінують у морському середовищі, в досліджених донних відкладеннях важливе місце посідає саме *B. subtilis* [13]. Важливо також відмітити високу подібність кількісного та якісного складу штамів, виділених з різних станцій, що знаходяться на великій глибині. Натомість *B. pumilus* та *B. cereus* представлені 5 та 1 штамом, відповідно, що в сумі складає 4,6% від загального числа.

Незвично виглядає велика різниця у частотах виділення між штамами *Bacillus megaterium* різних GC груп, що сягає майже 23%. Цікавою обставиною є висока частка виділення *Bacillus* sp. GC group 22, який не може бути ідентифікованим до виду за допомогою використаної версії системи MIDI Sherlock. Деякі дослідники ідентифікують такі штами як *Bacillus firmus* [61, 135].

Несподіваним фактом є виділення з проб різних станцій трьох штамів *Bacillus luciferensis*, типовий штам якого було виділено у 1997 році з вулканічного ґрунту на Південних Сендвічевих островах (Субантарктика) [80].

Залежність видового різноманіття від горизонту показує їх певну одноманітність за видовими спектрами (табл. 4.5).

Два з найбільш чисельних видів - *Bacillus megaterium* та *Bacillus subtilis* представлено на всіх горизонтах, окрім одного (25-30 см) у випадку першого і на всіх, окрім двох (25-30 та 30-35 см), для другого. Цікаво, що третій з «трійки лідерів» за чисельністю в колекції вид *Brevibacillus reuszeri* виявлено лише на трьох горизонтах (0-5, 5-10 та 15-20 см). Можна припустити, що видове різноманіття пулу ендоспор поступово знижується з глибиною і, відповідно, з віком донних відкладень.

Так, на першому горизонті (0-5 см) виявлено 4 унікальних (не виявлених на інших горизонтах) види (а саме *Bacillus megaterium* GC subgroup B, *Bacillus luciferensis*, *Bacillus oleronius* та *Lysinibacillus sphaericus* GC subgroup B) та 6 неідентифікованих ізолятів. На горизонті 5-10 см унікальних видів вже 2 (*Paenibacillus larvae* та *Bacillus cereus* GC subgroup A), а неви-

Таблиця. 4.5

Таксономічний склад споротвірних бактерій на різних горизонтах донних осадів

Горизонт, см	Вид
0-5	*Bacillus megaterium* GC subgroup B, *Bacillus megaterium* GC subgroup A, *Brevibacillus reuszeri*, *Bacillus* sp. GC group 22, *Bacillus pumilus* GC subgroup A, *Bacillus subtilis*, *Bacillus viscosus*, *Bacillus luciferensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus oleronius*, *Lysinibacillus sphaericus* GC subgroup B, 6 неідентифікованих штамів.
5-10	*Bacillus subtilis*, *Bacillus viscosus*, *Paenibacillus larvae*, *Bacillus megaterium* GC subgroup A, *Bacillus atrophaeus*, *Brevibacillus reuszeri,* *Bacillus cereus* GC subgroup A, 3 неідентифікованих штами.
10-15	*Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus* sp. GC group 22, *Bacillus pumilus* GC subgroup A, *Bacillus megaterium* GC subgroup A
15-20	*Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus choshinensis*, *Bacillus megaterium* GC subgroup A, *Bacillus pumilus* GC subgroup A, *Brevibacillus reuszeri*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus halmapalus*
20-25	*Bacillus megaterium* GC subgroup A, *Bacillus atrophaeus*
25-30	*Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp. GC group 22, *Bacillus subtilis*
30-35	*Bacillus* sp. GC group 22, *Bacillus megaterium* GC subgroup A, *Bacillus viscosus*, *Bacillus licheniformis*
45-50	*Bacillus megaterium* GC subgroup A, *Bacillus pumilus* GC subgroup A, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*

Таблиця 4.6

Видові патерни споротвірних бактерій з різних станцій

Станція 233		Станція 242		Станція 258		Станція 269	
Вид	**%**	**Вид**	**%**	**Вид**	**%**	**Вид**	**%**
Bacillus megaterium GC subgroup A	18,75	*Brevibacillus reuszeri*	20,50	*Bacillus subtilis*	18,20	*Bacillus megaterium* GC subgroup A	50
Brevibacillus reuszeri	18,75	*Bacillus subtilis*	15,40	*Bacillus megaterium* GC subgroup A	15,20	*Bacillus licheniformis*	10
Bacillus viscosus	15,0	*Bacillus megaterium* GC subgroup A	12,80	*Bacillus megaterium* GC subgroup B	15,20	*Bacillus pumilus* GC subgroup A	10
Bacillus licheniformis	13,0	*Bacillus viscosus*	12,80	*Bacillus* sp. GC group 22	12,10	*Bacillus subtilis*	10
Bacillus subtilis	13,0	*Bacillus licheniformis*	7,70	*Bacillus viscosus*	9,0	*Bacillus viscosus*	10
Bacillus atrophaeus	6,0	*Bacillus luciferensis*	5,10	*Bacillus licheniformis*	6,10	*Lysinibacillus sphaericus* GC subgroup B	10
Bacillus megaterium GC subgroup B	4,0	*Bacillus pumilus* GC subgroup A	5,10	*Brevibacillus reuszeri*	6,10	-	-
Bacillus cereus GC subgroup A	2,0	*Bacillus atrophaeus*	2,60	*Bacillus atrophaeus*	3,0	-	-
Bacillus sp. GC group 22	4,0	*Bacillus* sp. GC group 22	2,60	*Bacillus pumilus* GC subgroup A	3,0	-	-
Bacillus luciferensis	2,0	*Bacillus oleronius*	2,60	*Brevibacillus choshinensis*	3,0	-	-
Bacillus pumilus GC subgroup A	2,0	-	-	*Paenibacillus larvae*	3,0	-	-
Не визначено	4,0	Не визначено	12,8	Не визначено	6,10	-	-

значених - три. Серед більш глибоких горизонтів унікальні види (*Brevibacillus choshinensis* та *Bacillus halmapalus*) виявлено лише на горизонті 15-20 см [61].

При порівнянні між собою розподілів видів по окремих станціях помітним стає факт великої їх схожості (табл. 4.6). В усіх випадках *Bacillus megaterium* GC subgroup A входить до трійки найбільш численних представників. Цей факт знаходить підтвердження при порівнянні між собою індексів різноманітності Сімпсона, розрахованих для станцій 233, 242, 258 та 269, які дорівнюють, відповідно, 0,1; 0,1; 0,08 та 0,2, тобто практично не відрізняються.

Видову приналежність 11 досліджуваних штамів за порівнянням спектрів жирних кислот, наявних в автоматичній системі, встановити не вдалося. Це може свідчити про те, що можливо вони відносяться до ще невідомих науці видів, і можуть слугувати цікавими об'єктами для подальших досліджень.

Таким чином, всі штами аеробних споротвірних бактерій, виділені в ході дослідження з донних відкладень Чорного моря, належать до видів, що відомі з суходолу чи мають космополітичне поширення. Виходячи з їх чисельності у донних осадах та екстремальних умов в місцях їх виявлення можна припустити, що найбільш ймовірно вони відносяться до алохтонної мікробіоти, яка сформувалася шляхом виносу споротвірних бактерій з біотопів суходолу в море з наступним осіданням на дно і захороненням у товщі морських осадів, де завдяки високій стійкості ендоспори довгий час можуть зберігати життєздатність. Зібрана колекція культур споротвірних бактерій, яка включена до складу Колекції морських та практично корисних мікроорганізмів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, може слугувати перспективним джерелом для подальших пошуків продуцентів біологічно активних сполук.

4.3. Антимікробна активність спороутворювальних бактерій

Більшість досліджень, що фокусуються на пошуку продуцентів антибіотиків, стосуються мікроорганізмів ґрунту. Морське середовище є значно менш дослідженим у цьому плані, і може слугувати перспективним джерелом для пошуку нових проду-

центів для біотехнологічних досліджень. Особливо це стосується такого специфічного за своїми екстремальними умовами регіону Світового Океану, як Чорне море, в якому вода з глибини 100-150 м насичена сірководнем і характеризується глибоко анаеробними умовами, що робить цю водойму унікальною [113, 141]. Виходячи з цього, можна очікувати на виявлення у цьому середовищі нових антимікробних механізмів та продуцентів нових антибіотиків. Пошук та розробка нових антимікробних препаратів може мати велике значення для боротьби з полірезистентними збудниками інфекційних захворювань [32, 81].

Вивчення антагоністичної активності природних ізолятів бактерій цікаве не лише з прикладної, але і з фундаментальної точки зору – це дає уявлення про характер та ступінь вираженості конкурентних відношень у біотопі, з якого виділені ці бактерії-антагоністи [52, 81].

При проведенні дослідження виділених та ідентифікованих 247 ізолятів споротвірних бактерій антагоністично активними виявилися 79, що становить близько 32%. З таблиці 4.7 видно, що найбільш активними досліджувані штами були до *Candida albicans* ATCC 10231 (середній розмір зон інгібування росту - 21,75 мм), *Proteus vulgaris* ATCC 6896 (20,72 мм) та *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (16,53 мм). Найменш чутливими виявилися тест-штами *Pseudomonas aeruginosa* B-329 (6,52 мм), *Escherichia coli* ATCC 25922 (8,56 мм), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 (8,79 мм) [113].

Встановлено високий ступінь антагонізму споротвірних бактерій до грам-позитивних бактерій *S. aureus* та *B. cereus.* Частка активних бактерій по відношенню до них сягає 89% та 85%, відповідно, серед усіх активних штамів. Антагонізм до представників ентеробактерій (*Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) дорівнював, відповідно, 68, 60 та 51%. На найнижчому рівні була антагоністична активність по відношенню до *Pseudomonas aeruginosa*. Характерною деталлю є суттєва різниця між середньою антагоністичною активністю досліджуваних штамів по відношенню до індикаторних штамів *B. cereus* та *B. subtilis*. Найбільшу активність серед усіх ідентифікованих видів (86%) виявили представники видів *P. larvae, P. macerans* та

Таблиця 4.7

Антимікробна активність ізольованих споротвірних бактерій з глибоководних відкладень Чорного моря

Вид, штам	Станція, горизонт (см)	1*	2	3	4	5	6	7	8	9
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
*B. licheniformis*055	233, 0-5	3,0	4,0	4,0	5,0	0,0	2,0	3,0	3,0	3,0
*B. megaterium*955	233, 0-5	24,0	0,0	34,0	7,0	29,0	0,0	6,0	0,0	0,0
*B. subtilis*219	233, 5-10	24,0	0,0	32,0	13,5	27,0	5,0	6,5	0,0	0,0
*B. subtilis*211	233, 5-1	32,5	0,0	35,0	17,0	35,0	6,0	17,5	8,5	0,0
*B. subtilis*203	233, 5-10	29,0	0,0	35,0	13,5	25,0	8,0	13,0	8,0	0,0
*B. subtilis*204	233, 5-10	32,0	0,0	35,0	15,0	30,0	11,0	11,5	2,0	2,5
B. atrophaeus 200	233, 5-10	35,0	2,5	35,0	19,0	35,0	7,0	21,0	9,0	0,0
*B. cereus*213	233, 5-10	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*B. subtilis*212	233, 5-10	32,0	0,0	35,0	14,5	35,0	7,5	15,0	4,0	0,0
*B. atrophaeus*010	233, 10-15	5,0	3,5	4,0	10,0	5,0	5,0	2,5	1,0	0,0
*B. licheniformis*043	233, 15-20	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*B. licheniformis*014	233, 15-20	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*B. pumilus*002	233, 15-20	0,0	0,0	8,0	6,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*B. pumilus*004	233, 15-20	3,5	3,5	5,0	9,5	0,0	4,0	3,0	2,0	2,0
*B. megaterium*003	233, 15-20	0,0	0,0	7,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
*B. licheniformis*012	233, 15-20	0,0	0,0	6,5	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10
B. licheniformis 99B	233, 20-25	0,0	0,0	2,5	10,5	5,0	0,0	0,0	0,0	6,5
B. atrophaeus 99A	233, 20-25	3,5	0,0	0,0	14,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0
*B. licheniformis*005	233, 25-30	0,0	0,0	10,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*B. licheniformis*001	233, 30-35	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B. subtilis 920	233, 0-5	-**	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	-	9,0
*B. amyloliquefaciens*921	233, 0-5	-	11,0	10,0	-	11,0	11,0	-	-	12,0
B. pumilus 99A	258, 0-5	33,0	0,0	30,0	14,0	35,0	5,0	18,5	10,0	0,0
***B. megaterium* ONU 554**	**258, 0-5**	**35,0**	**0,0**	**36,0**	**29,0**	**0,0**	**5,0**	**0,0**	**3,0**	**32,0**
B. pumilus 232	258, 5-10	0,0	0,0	5,0	3,5	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0
P. larvae 018	258, 5-10	25,5	0,0	30,0	15,5	26,5	4,0	7,5	8,5	5,0
*P. larvae*019	258, 5-10	5,5	0,0	0,0	14,5	0,0	3,5	0,0	0,0	6,5
*B. subtilis*231	258, 5-10	35,0	5,0	35,0	16,0	28,0	7,5	18,0	9,0	8,0
*B. subtilis*217	258, 5-10	27,5	3,0	35,0	16,5	35,0	9,0	10,0	7,5	0,0
*B. subtilis*247	258, 10-15	19,5	2,0	28,0	15,0	22,0	9,5	10,5	10,0	0,0
*B. atrophaeus*246	258, 10-15	0,0	0,0	3,5	6,50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*B. subtilis*021	258, 10-15	6,0	3,0	11,0	20,0	35,0	12,5	12,5	14,0	0,0
*B. subtilis*239	258, 30-35	30,0	0,0	35,0	14,5	30,0	7,0	17,0	13,0	0,0
*B. megaterium*035	258, 30-35	34,0	0,0	35,0	20,0	35,0	13,0	21,5	15,0	0,0
*B. megaterium*069	242, 0-5	0,0	0,0	1,50	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
P. macerans 953	242, 0-5	-	9,0	15,5	-	16,5	15,5	-	-	7,0

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
*B. reuszeri*031	242, 0-5	2,0	0,0	4,0	19,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B. megaterium 957	242, 0-5	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	-	9,0
*B. megaterium*067	242, 0-5	4,5	0,0	1,5	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B. subtilis 959	242, 0-5	-	0,0	10,0	-	0,0	8,0	-	-	0,0
***B. subtilis* ONU 559**	**242, 0-5**	**30,0**	**2,50**	**31,0**	**19,0**	**36,5**	**12,5**	**19,0**	**8,0**	**4,0**
*B. pumilus*229	242, 0-5	21,5	0,0	32,5	5,0	21,5	0,0	0,0	5,0	0,0
B. agaradhaerens 960	242,0-5	-	14,0	13,5	-	13,5	15,5	-	-	7,0
B. subtilis 923	242, 0-5	30,0	2,5	33,0	13,5	33,0	5,5	9,0	3,5	0,0
B. subtilis 961	242, 0-5	-	0,0	9,0	-	0,0	0,0	-	-	0,0
B. subtilis 967	242, 0-5	-	0,0	6,0	-	0,0	5,5	-	-	0,0
B. subtilis 968	242, 0-5	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	-	13,0
*B. megaterium*032	242, 0-5	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B. subtilis 970	242, 0-5	-	11,0	13,0	-	0,0	12,0	-	-	0,0
B. megaterium 980	242, 0-5	-	7,0	7,5	-	0,0	0,0	-	-	0,0
B. licheniformis 986	242, 0-5	-	0,0	0,0	-	0,0	10	-	-	0,0
B. pumilus 989	242, 0-5	-	9,0	0,0	-	0,0	0,0	-	-	0,0
*B. subtilis*001	242, 5-10	35,0	0,0	16,0	12,5	35,0	2,0	3,0	13,0	3,5
*B. subtilis*013	242,10-15	35,0	0,0	35,0	16,0	35,0	3,5	17,0	8,0	0,0
*B. pumilus*041	242, 10-15	7,0	0,0	20,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*B. atrophaeus*008	242, 10-15	0,50	3,0	1,5	5,0	0,0	1,5	1,0	0,0	2,0

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
*B. megaterium*040	242,10-15	35,0	0,0	16,0	7,5	27,0	3,0	4,5	11,0	0,0
*B. licheniformis*249	242, 15-20	0,0	0,0	0,0	7,5	2,50	1,0	0,0	0,0	0,0
*B. subtilis*251	242, 15-20	0,5	1,5	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5
*B. subtilis*248	242, 15-20	0,0	2,0	6,0	6,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
*B. licheniformis*245	242, 25-30	0,0	0,0	7,5	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*B. subtilis*033	242, 25-30	0,0	1,5	1,5	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B. pumilus 932	269, 0-05	-	5,0	5,0	-	0,0	13,0	-	-	5,0
*B. megaterium*063	269, 0-05	12,0	0,0	23,5	0,0	13,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*B. pumilus*049	269, 45-50	1,5	0,0	17,5	10,5	35,0	2,0	4,5	10,0	0,0
*B. megaterium*051	269, 45-50	9,0	0,0	20,5	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
*B. subtilis*053	269, 45-50	35,0	0,0	30,0	19,0	33,0	12,5	19,5	8,0	0,0
*B. megaterium*054	269, 45-50	28,0	0,0	35,0	15,0	29,5	3,5	16,5	14,0	0,0
*B. licheniformis*048	269, 45-50	18,0	0,0	22,5	6,5	27,5	2,0	8,0	8,0	0,0
B. atrophaeus 993	249, 0-16	-	15,0	16,0	-	15,0	0,0	-	-	14,0
B. subtilis 997	249, 0-16	-	0,0	27,0	-	15,0	10,0	-	-	28,0
B. subtilis 941	116, 0-02	-	9,0	15,0	-	13,0	12,0	-	-	13,0
B. subtilis 943	116, 0-02	-	15,0	11,0	-	18,0	14,0	-	-	13,0
*B. amyloliquefaciens*946	116, 0-02	-	7,5	7,5	-	8,50	14,0	-	-	19,5
*B. subtilis*902	116, 0-05	-	0,0	6,0	-	13,0	11,0	-	-	12,5
B. subtilis 903	116, 0-05	-	5,5	5,5	-	11,5	0,0	-	-	7,0

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
***B. subtilis* ONU 553**	**116, 0-05**	**29,0**	**0,0**	**29,0**	**0,0**	**0,0**	**31,5**	**31,0**	**30,0**	**9,0**
*B. amyloliquefaciens*905	116, 0-05	-	7,5	15,5	-	6,5	13,0	-	-	14,0
B. agaradhaerens 906	116, 0-05	-	7,5	13,5	-	6,5	15,5	-	-	14,0
B. subtilis 907	116, 0-05	-	6,5	7,0	-	7,0	11,5	-	-	12,5
*B. amyloliquefaciens*908	116, 0-05	-	7,0	8,0	-	11,5	15,5	-	-	8,5
B. subtilis 909	116, 0-05	-	16,0	14,0	-	16,0	-	-	-	14,0
Середнє***		20,72	6,52	16,53	11,83	21,75	8,56	11,98	8,79	10,06
Частка активних штамів (%)		68	38	89	85	57	60	51	47	39

Примітка: *- 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;

** - Не визначено;

*** Середнє значення розміру зон відсутності росту тест штамів у міліметрах без урахування нульових значень.

B. atrophaeus. Значна активність відмічалася у бактерій видів, які відомі з даних літератури як продуценти бактеріоцинів та антибіотиків - *B. subtilis* з показником 60% та *B. licheniformis* - 58%, *B. amyloliquefaciens* - 57%, відповідно.

Цікаво, що дуже близьке значення до вищезгаданих штамів продемонстрували споротвірні бактерії виду *B. agaradhaerens* (66%), для якого не зареєстровано здатності до синтезу антибіотиків чи бактеріоцинів. Найбільш низька активність відмічалася для штамів видів *B. megaterium* (26%), *B. pumilus* (19%), *B. cereus* (17%) та *B. reuszeri* (6%) [113].

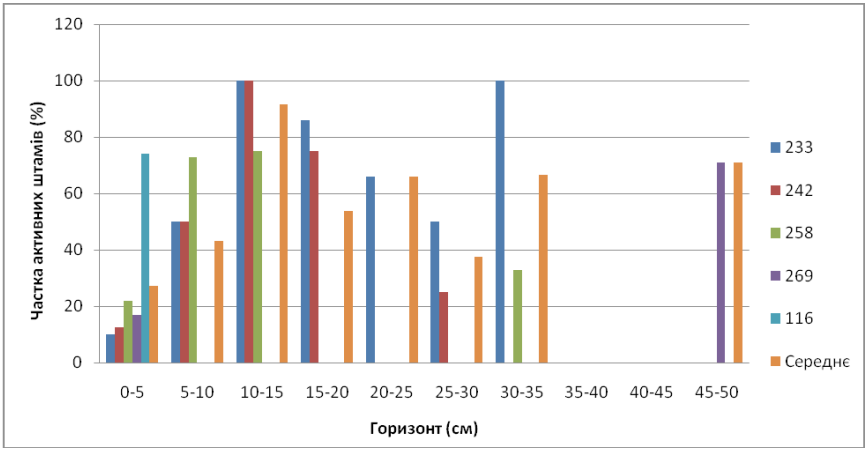

Рис. 4.8 Частка (%) активних штамів споротвірних бактерій на різних горизонтах осадів

Антимікробна активність досліджуваних штамів певним чином залежала від глибини горизонту, з якого вони були отримані, хоча чіткої закономірності встановити неможливо. Характер даної залежності можна описати як поступове зростання частки антагоністично активних штамів від поверхні до глибини 15 см, із наступним поступовим зниженням до значень 40% на горизонті 25-30 см (рис. 4.8).

Таким чином, отримані дані свідчать про перспективність природним чином законсервованих морських бактерій у донних відкладеннях Чорного моря для пошуку продуцентів нових анти-

мікробних препаратів проти збудників опортуністичних інфекцій людини.

За показниками антимікробної активності було відібрано штами *B. subtilis* ONU 553 (висока активність по відношенню до ентеробактерій), *B. megaterium* ONU 554 (активний по відношенню до грам-позитивних бактерій, включаючи *S. aureus*) та *B. subtilis* ONU 559 (активний по відношенню до *C. albicans*) для подальших досліджень їх біологічних властивостей, аналізу спектра екзометаболітів та геномів шляхом їх секвенування [113].

Активні штами, наведено в табл. 4.7, під видовими назвами, які було встановлено за результатами ідентифікації шляхом порівняння жирнокислотних спектрів. Результати аналізу секвенованих геномів даних штамів змінили ідентифікацію двох штамів (*B. megaterium* ONU 554 було перевизначено як *B. pumilus*, а *B. subtilis* ONU 553 як *B. velezensis*). У подальшому тексті для позначення трьох обраних штамів використовується саме видова ідентифікація, визначена за геномними показниками.

4.4. Біологічна характеристика *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554, *B. subtilis* ONU 559

4.4.1. Культуральна та морфологічна характеристика

Згідно з даними літератури, для видів *B. velezensis*, *B. pumilus* та *B. subtilis* характерне поєднання високої різноманітності морфотипів колоній та одноманітність морфології клітин [80]. Отримані дані узгоджуються з цими положеннями. Так, всі три штами: *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 демонструють дуже різну морфологію колоній. Колонії штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. pumilus* ONU 554 мають слизову консистенцію, діаметр 6,5-7,0 мм. Поверхня опукла, матова, у бактерій штаму *B. velezensis* ONU 553 - в слабко рельєфних складках, а в *B. pumilus* ONU 554 має блискучий піднесений валик з краю та складчастість в самому центрі. Край колоній *B. pumilus* ONU 554 гладенький, колір сірувато-жовтуватий; для *B. velezensis* ONU 553 ті ж параметри, відповідно: край складнохвилястий, а колір біло-сіруватий.

Морфологія колоній штаму *B. subtilis* ONU 559 за тих самих умов культивування відчутно відрізняється. Вони майже повні-

стю пласкі за винятком тонкого невисокого валику по краю, мають діаметр 7,0-7,5 мм. Край хвилястий, поверхня матова, гладенька, консистенція мучниста.

Всі описані вище особливості морфології колоній лежать в межах відомих характеристик для відповідних видів [80].

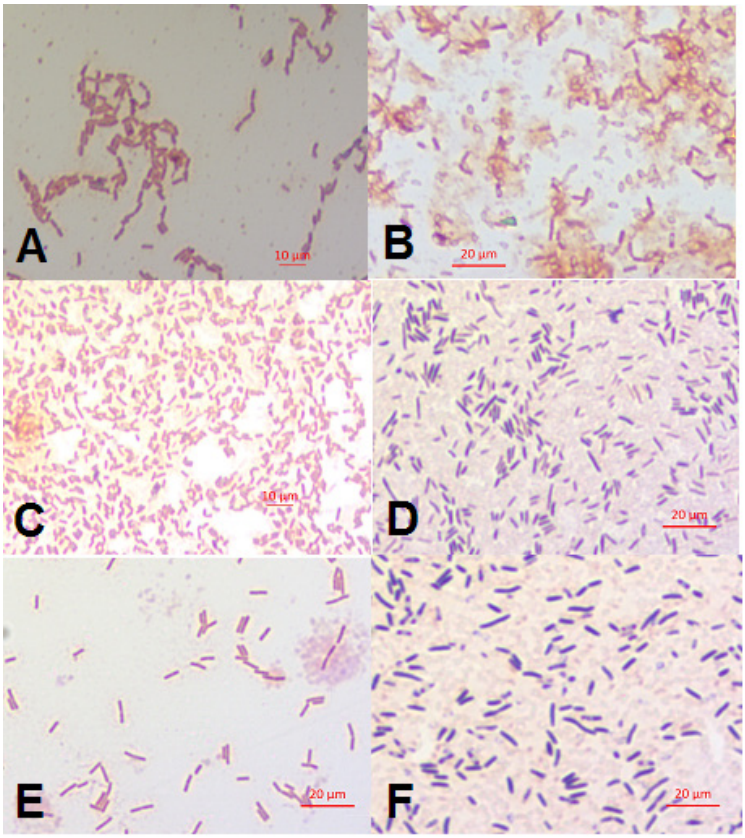

Рис. 4.9. Мікрофотографії бактерій *B. velezensis* ONU 553 (A), 24 год; *B. velezensis* ONU 553 (B), 96 год; *B. pumilus* ONU 554 (C), 24 год; *B. pumilus* ONU 554 (D), 96 год; *B. subtilis* ONU 559 (E), 24 год; *B. subtilis* ONU 559 (F), 96 год; забарвлення за Грамом, світлопольна мікроскопія (x1350)

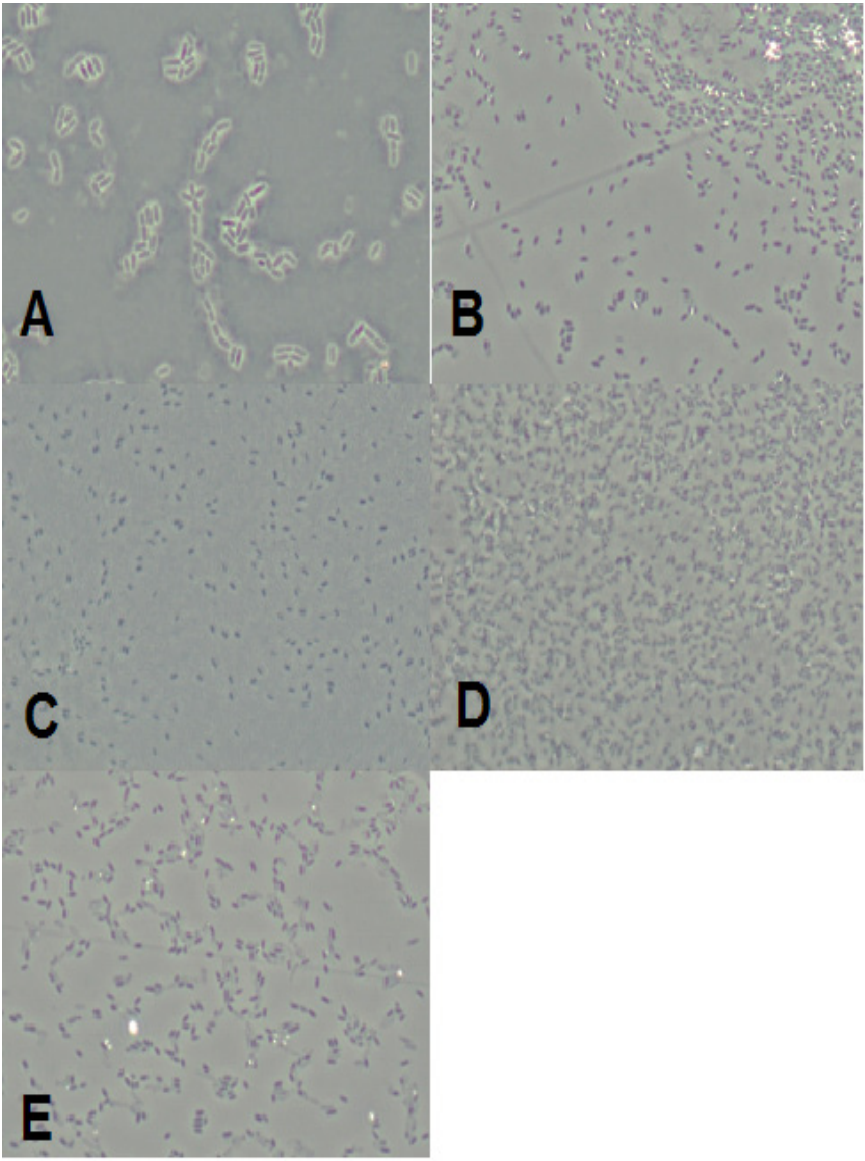

Рис. 4.10. Мікрофотографії бактерій *B. velezensis* ONU 553 (A), 24 год; *B. velezensis* ONU 553(B), 96 год; *B. pumilus* ONU 554 (C), 24 год; *B. pumilus* ONU 554 (D), 96 год; *B. subtilis* ONU 559 (E), 96 год; фазово-контрастна мікроскопія (x1350)

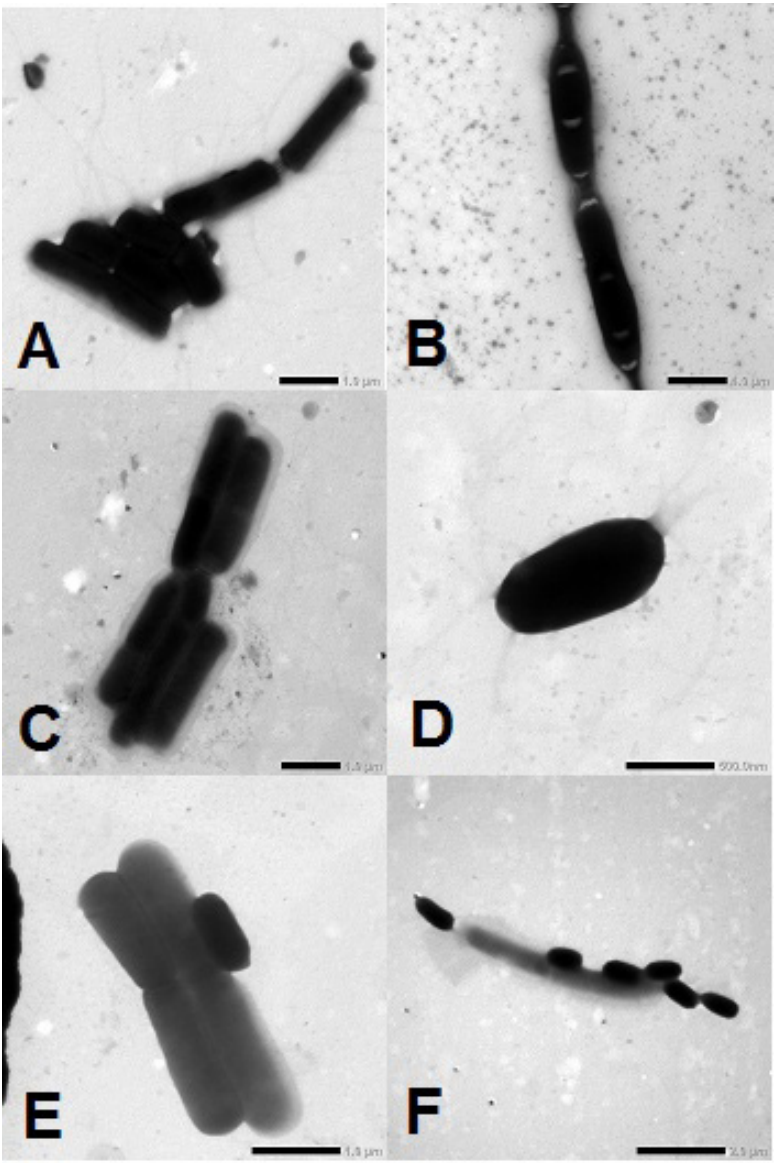

Рис. 4.11. Електронні мікрофотографії бактерій, зроблені з використанням трансмісивної електронної мікроскопії (х15000): А, В – *B. velezensis* ONU 553; С, D – *B. pumilus* ONU 554; E, F - *B. subtilis* ONU 559

Дані мікроскопії бактерій та ендоспор досліджених штамів також підтримують уявлення про уніформність клітин трьох видів. Згідно даним літератури, ступінь вираженості їх забарвлення за грам-позитивним типом значною мірою залежить від віку культури (рис. 4.9) [80]. Розміри клітин цих бактерій вкладаються в діапазон 0,6-0,8 мкм в ширину та 2-3 мкм у довжину (рис. 4.11). Клітини поодинокі або попарні, рідко в невеликих ланцюжках. Ендоспори бактерій мають форму близьку до циліндричної (4.10, 4.11).

4.4.2. Фізіолого-біохімічні властивості

Вивчення фізіолого-біохімічних властивостей продемонструвало, що для штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. pumilus* ONU 554 відмічено по одному принциповому відхиленню від типів реакцій, характерних для 85% штамів відповідних видів (табл. 4.8). Відмічено, що споріднені види *B. velezensis* та *B. amyloliquefaciens* практично не відрізняються за патернами утилізації цукрів [44].

Для штаму *B. velezensis* ONU 553 відмічена атипова відсутність здатності до утилізації гентибіози, а для *B. pumilus* ONU 554 - рафінози. Якщо генетика утилізації бацилами гентиобіози не відома з даних літератури, то для рафінози вона вивчена. При секвенуванні геному нами показано відсутність компонентів відповідного оперону *raf* у бактерій *B. pumilus* ONU 554. Бактерії *B. subtilis* ONU 559 відрізняються від типового штаму п’ятьма ознаками. Генетичні детермінанти ознак здатності до утилізації трегалози, сахарози, глікогену та амілодекстрину, виявлені в геномі за даними автоматичного анотатору PATRIC, хоча не були виявлені в даному дослідженні. Відсутність здатності до утилізації гентибіози важко піддається інтерпретації через пояснені вище обставини. Вцілому, такі результати щодо *B. subtilis* ONU 559 суперечать його надійній ідентифікації до даного виду за всіма іншими методами і дають підстави підозрювати атиповість даного штаму (що також виглядає ймовірним на фоні масштабних геномних делецій у порівнянні з геномом типового штаму – див. розділ 4.6.1.).

Вивчення резистентності до антибіотиків показало, що на тлі відносно низької антибіотикорезистентності бактерій роду *Bacillus* неклінічного походження бактерії, ізольовані з відкла-

Таблиця 4.8

Утилізація вуглеводів бактеріями *B. velezensis* ONU 553 (A), *B. pumilus* ONU 554 (B), *B. subtilis* ONU 559 (C)

| | | |

день, виявилися вразливими майже до всіх антибіотиків, використаних для тесту (табл. 4.9). Надзвичайно висока чутливість бактерій до антибіотиків часто навіть заважала точному вимірюванню зон затримки росту, які могли сягати в діаметрі половини діаметру чашки Петрі. Високою виявилася лише резистентність до беталактамних антибіотиків, так, до цефіксиму *B. pumilus*

Таблиця 4.9

Резистентність до антибіотиків штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554, *B. subtilis* ONU 559

Антибіотик	***B. velezensis* ONU 553**	***B. pumilus* ONU 554**	***B. subtilis* ONU 559**
Еритроміцин	32	22	28
Олеандоміцин	31	26,5	30,5
Ріфампіцин	24,5	29,5	16
Ампіцилін	27,5	35	35,5
Тетрациклін	7	37	31
Стрептоміцин	27	28	29,5
Нетілміцин	+	31,5	35
Бензилпеніцилін	14	23,3	23
Канаміцин	28,8	28,5	24
Оксицилін	24	20,80	30
Цефазолін	36	29	34
Левоміцетин	31,3	28	29
Левофлоксацин	40,5	+	33
Азитроміцин	25,5	24	22,3
Цефоперазон	32,5	27,5	34
Лінкоміцин	25,5	18	29
Цефалексин	42	31,5	47
Цефіксим	17	R	15
Фурагін	29	28,5	35,5

Примітка. Дані наведено як радіуси зон затримки росту в мм. R– резистентний. + - чутливий, але зону затримки росту не вдалося виміряти через інтерференцію.

ONU 554 навіть виявився повністю резистентним. Несподіваною є відносна нечутливість штаму *B. velezensis* ONU 553 до дії тетрацикліну.

4.5. Біохімічний склад *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554, *B. subtilis* ONU 559

4.5.1. Спектри жирних кислот

Аналіз спектрів жирних кислот досліджених штамів в цілому виявив риси характерні для представників роду *Bacillus* та групи видів *Bacillus subtilis,* зокрема [11]. До даної групи, окрім вищезазначеного, входять такі види, як *Bacillus megaterium*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. amiloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. mojavensis* тощо [80, 85]. Багато штамів групи є продуцентами різноманітних біологічно активних речовин, зокрема антибіотиків та бактеріоцинів.

Для представників роду *Bacillus* характерним є переважання розгалужених жирних кислот із довжиною вуглецевого ланцюга від 14 до 17 атомів (табл. 4.10). Також до характеристики ЖК-спектрів, притаманних групі *Bacillus subtilis* входить значне переважання насичених жирних кислот над ненасиченими, яке наближається до 100% в деяких випадках, значення індексу теплової адаптації (heat adaptation index - далі HAI), близькі до одиниці, а значення співвідношення 15:ізо та 15:антеізо жирних кислот (індекс a15/i15) між 1,0 та 3,0 [73]. Ознаки останньої групи були у випадку досліджених штамів проявлені так само чітко, як це зазвичай, характерно для групи *Bacillus subtilis*. Ця обставина стане нижче предметом обговорення. Підрахунок HAI виконували за формулою [40]:

$$\mathrm{HAI} = \frac{(\mathrm{n14:0}) + \mathrm{p(n16:0)} + \mathrm{p(i14:0)} + \mathrm{p(i15:0)} + \mathrm{p(i16:0)} + \mathrm{p(i17:0)}}{\mathrm{p(a15:0)} + \mathrm{p(a17:0)} + \mathrm{p(n16:1)} + \mathrm{p}\big(\mathrm{i17:1(n-10)}\big) + \mathrm{p(16:1\omega7calcohol)}}$$

де p - частка певної жирної кислоти.

Значення sim-індексів, що вказують на подібність визначеного жирнокислотного спектру до такого у типового штаму цього виду, визначеного за стандартною методикою, для всіх штамів виявилися досить високими для видової ідентифікації, тобто більшими за 0,500.

Таблиця 4.10

Спектри жирних кислот *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559

Жирна кислота	*Bacillus velezensis* ONU 553	*Bacillus pumilus* ONU 554	*Bacillus subtilis* ONU 559
15:0 anteiso	37,16	42,69	36,50
15:0 iso	25,47	42,89	22,75
17:0 iso	10,16	2,09	13,79
17:0 anteiso	8,60	4,81	12,95
16:0	3,81	0,90	2,19
16:0 iso	2,97	1,59	2,89
17:1 iso w10c	1,96	0,41	2,05
16:1 w11c	1,63	0,33	0,88
17:1 iso w5c	1,46	0,64	0
14:0 iso	1,22	0,70	0,80
14:0	0,91	0,49	0,30
16:1 w7c alcohol	0,70	0,35	0,59
17:0	0,64	0	0
13:0 anteiso	0,36	0	0
14:0 anteiso	0,27	0	0
11:0 2OH	0,24	0	0
15:1 w5c	1,46	0,53	0,49
13:0 anteiso	0	0,43	0,16
13:0 iso	0	0,40	0,13
15:0 iso 3OH	0	0,23	0
18:0	0	0	0,79
17:0 iso 3OH	0	0	0,20
19:0 iso	0	0	0,30
19:0 anteiso	0	0	0,17
17:0 2OH	0	0	0,14
17:1 iso I/anteiso B	0,99	0,52	1,91
% C:15	0,63	0,86	0,59
% насичених ЖК	91,80	97,22	94,08
a15/i15	1,46	0,995	1,60
HAI	0,89	1,00	0,81
sim -індекс 1	0.812	0,655	0,846
sim -індекс 2	-	0,607	-

Показники HAI та a15/i15, що є оцінкою термофільності та були розроблені саме для представників роду *Bacillus*, розраховані за формулами, запропонованими Diomandé et al. [40]. Їх значення інтерпретується наступним чином: якщо HAI приймає значення близьке до одиниці, то штам мезофільний; якщо він більший чи менший, то, він ідентифікується, відповідно, як термофільний чи психрофільний. Аналогічно інтерпретується коефіцієнт a15/i15: мезофільні штами мають значення між 1 та 3, термофільні та психрофільні – менші за 1 та більші за 3, відповідно[11].

Інтерпретуючи в такому ключі отримані дані, можна дійти висновку, що показники HAI та a15/i15 штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 характерні для мезофільних бактерій [40, 41], що підтверджує також їх активний ріст за інкубації при 30 °C.

Також слід відзначити унікальні для кожного штаму жирні кислоти – для *B. velezensis* ONU 553 це 17:0, 13:0 anteiso, 14:0 anteiso, 11:0 2OH. Для *B. pumilus* ONU 554 такою жирною кислотою є 15:0 iso 3OH, для *B. subtilis* ONU 559 - 18:0, 17:0 iso 3OH, 17:0 2OH, 19:0 iso, 19:0 anteiso [11].

4.5.2. Амінокислотний склад

Вміст виявлених амінокислот по спаданню масової долі у бактерій досліджуваних штамів принципово не відрізняється (табл. 4.11).

В роботі [89] було запропоновано метод аналізу амінокислотного складу для організмів різних біологічних ніш. Авторам вдалося виявити, що за розташування амінокислот за спаданням їх вмісту організми різних біотопів демонструють певні сигнатури чи патерни чергування амінокислот у таких спектрах.

Аналіз отриманих нами даних не виявив однозначної відповідності з жодним із запропонованих Moura патернів. Спостерігається певне наближення до інвертованого патерну, характерного для біоти піщаних ґрунтів (у зростаючій кількості: аргінін-лізин-лейцин-аланін-аспарагін/аспартат), що може мати відношення до вихідного місця походження даних штамів.

Також встановлено, що компоненти патерну, характерного для морських організмів, групуються на початку переліку аміно-

кислот, практично не відтворюючи досить цікавий саме в даному випадку мотив (по зростанню: аланін-триптофан-гліцин-глутамін/глутамат-лейцин). Для об'єктивного порівняння порядків було використано тест рангової кореляції Кендела. Результати обрахування даного показнику наведено у таблиці 4.12.

Таблиця 4.11

Амінокислотний склад *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554, *B. subtilis* ONU 559

***Bacillus velezensis* ONU 553**	***Частка, %**	***Bacillus pumilus* ONU 554**	**Частка, %**	***Bacillus subtilis* ONU 559**	**Частка, %**
L-Arg	18,12	Gly	19,83	L-Arg	17,67
Gly	17,21	L-Arg	16,61	Gly	17,53
L-Glu	13,25	L-Leu	9,73	L-Glu	10,24
L-Leu	7,29	L-Glu	9,65	L-Ala	8,40
L-Ala	7,21	L-Ala	7,03	L-Leu	7,91
L-Pro	6,83	L-Iso	6,43	L-His	6,56
L-Iso	6,62	L-His	5,97	L-Iso	6,35
L-Tyr	4,88	L-Tyr	4,68	L-Tyr	4,89
L-His	4,62	L-Pro	4,39	L-Pro	4,81
L-Phe	3,94	L-Phe	4,09	L-Phe	3,92
L-Ser	3,25	L-Ser	3,28	L-Ser	3,17
L-Val	3,12	L-Val	2,85	L-Val	2,86
L-Asp	2,30	L-Asp	2,31	L-Asp	2,57
L-Thr	1,35	L-Thr	1,58	L-Met	1,71
L-Met	-	L-Met	1,57	L-Thr	1,42

Примітка: * - Частка (%) від загальної суми площ піків

Таблиця 4.12

Значення коефіцієнту рангової кореляції Кендела для наборів амінокислот дослідних штамів та даних літератури

Штам	A		B	
	τ	p-value	τ	p-value
B. velezensis ONU 553	0,544	0,01	0,128	0,542
B. pumilus ONU 554	0,544	0,01	0,032	0,879
B. subtilis ONU 559	0,384	0,067	0,032	0,879

Примітка: Порівняння проведено за даними амінокислотного пулу: A –біоти піщаних ґрунтів, B – біоти океану [89], τ – коефіцієнт кореляції Кендела. Значення τ вважається значущим, якщо відповідне значення p-value менше за 0,05.

Амінокислотні патерни штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. pumilus* ONU 554 демонструють значущу і пряму кореляцію з відповідним патерном біоти піщаних ґрунтів, в той час як їх кореляція з патерном океанічної біоти слабка і незначуща. Це можна інтерпретувати як аргумент на користь походження досліджуваних штамів з піщаних пляжів узбережжях Чорного моря. Амінокислотний патерн штаму *B. subtilis* ONU 559 не корелює з жодним з запропонованих, що можна в свою чергу пояснити його походженням з біотопів суходолу [11].

4.5.3. Спектри моноцукрів

Вміст моносахаридів для досліджених чорноморських споротвірних бактерій носить в цілому очікуваний характер (табл. 4.13). У грам-позитивних бактерій рибоза входить до складу РНК та у більшості бацил до тейхоєвих кислот, і цілком природно очікувати її наявність у тій самій ролі у клітинних стінках штамів філогенетично близьких видів [109]. Рамноза для бацил відома лише у складі ендоспор та її наявність, окрім *B. velezensis* ONU 553, може свідчити про початок процесу ендоспороутворення у бактерій. Цікавою в цьому контексті є відсутність рідкісного цукру хіновози, характерного для ендоспор *B. subtilis* та вегета-

тивних форм деяких штамів цього виду [138]. Велика кількість глюкози пояснюється з позицій її ролі в енергетичному обміні прокаріот та зокрема фірмікут [11].

Високий вміст галактози відомий для *Bacillus anthracis*, що відрізняє даний вид навіть з досить однорідної групи *B. cereus. У* невеликій кількості, приблизно на два порядки меншій за відповідні показники для глюкози, галактоза також давно відома як компонент клітин *Bacillus subtilis,* проте її точна локалізація та функція в клітині невідомі [100, 138]. Арабіноза невідома як компонент клітин бацил та взагалі фірмікут. Серед прокаріот вона відома лише для деяких актинобактерій як компонент арабіногалактану[42, 51].

Таблиця 4.13

Моносахаридний склад *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554, *B. subtilis* ONU 559

Моносахарид	***Bacillus subtilis* ONU 553**	***Bacillus pumilus* ONU 554**	***Bacillus subtilis* ONU 559**
Арабіноза	3,8210*	4,8189	1,8306
Галактоза	2,6950	4,0278	5,7860
Глюкоза	53,7670	6,7654	37,0567
Рамноза	0	17,4851	1,7592
Рибоза	6,7820	0	1,1844
L-ідитол	5,7000	9,5021	8,2531
Міоінозитол	0	3,6773	3,3938

Примітка: *вміст у % від загальної суми площ піків.

У досліджених штамів виявлені також два багатоатомні спирти - L-ідітол (у всіх штамів) та міоінозитол (у всіх штамів, окрім *B. velezensis* ONU 553), у штаму *B. subtilis* ONU 559 - редукуючий дисахарид тураноза, у штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. pumilus* ONU 554 – глікозидсалірепін.

Таким чином, аналіз результатів біохімічного складу за індексами термофільності та аналізом амінокислотних спектрів за методом Moura дають підстави вважати, що досліджувані штами бактерій не відносяться до аборигенних представників морської біоти, але для підтвердження цього необхідно провести додаткові дослідження [11].

4.6. Характеристика геномів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554, *B. subtilis* ONU 559

4.6.1. Загальна характеристика геномів

Для з'ясування загальної характеристики геномів досліджуваних штамів та виявлення генів, що відповідають за синтез біологічно активних, зокрема антимікробних, сполук та уточнення попередньої ідентифікації, проведеної за спектрами жирних кислот, досліджуваних бактерій донних осадів активних антагоністів, було проведено секвенування геномів з використанням сервера TYGS, інструментарій якого поєднує алгоритми повногеномного порівняння та 16S рДНК філогенію.

Отримані таким чином результати виявили, що геноми бактерій *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559, попередньо ідентифіковані як представники виду *B. subtilis,* належать, відповідно до видів *B. velezensis*(група *B. subtilis*, підгрупа *B. amyloliquefaciens*) та *B. subtilis*. Геном бактерій *B. pumilus* ONU 554, раніше ідентифікованих як *B. megaterium,* демонструє найбільшу подібність до геному *B. pumilus* SH-B9 [6, 114].

Показник цифрової ДНК-ДНК гібридизації (dDDH) пари геномів *Bacillus subtilis* ATCC 6051 та *Bacillus subtilis* ONU 559 складає 88,2%, що вище за межу видів у 70%. Різниця вмісту ГЦ-пар між цими геномами складає 0,05%, що також менше за межу видової подібності у 0,1%. Для геному штаму *Bacillus velezensis* ONU 553 з геномом штаму *Bacillus velezensis* FZB42 показник dDDH дорівнює 90,06%, що значно перевищує межу видової подібності за даним критерієм (70%). Відповідний показник для пари штамів *B. velezensis* ONU 553 та типового для свого виду штаму *B. amyloliquefaciens* DSM7 складає 56,3%, що відповідно нижче за поріг у 95%. Дане порівняння було проведено з метою спроби вирішити одну з головних проблем ідентифікації

штамів виду *B. velezensis* – їх відмінності від спорідненого виду *B. amyloliquefaciens*. Вміст ГЦ пар *Bacillus velezensis* ONU 553 складає 46,69%, що незначно перевищує максимальний відомий показник для даного виду (46,64%) – різниця показників складає 0,05%, що відповідає показнику типового штаму [80]. Дещо більш проблематичною, як було сказано вище, є видова ідентифікація штаму *Bacillus pumilus* ONU 554. Показник dDDH з типовим штамом цього виду *Bacillus pumilus* NCTC 10337 складає лише 64,5%, що менше за критерій у 70% [17]. Різниця ГЦ-вмісту становить 0,22, що значно перевищує критичний показник видового розмежування.

На жаль, ряд інструментів повногеномного порівняння не зміг бути реалізований на базі TYGS, тому прийнято рішення для підтвердження видової ідентифікації зробити додатковий аналіз таксономічного статусу даних геномів за допомогою методів orthoANI та GGCD, реалізованих у програмі OAT. Дана програма також надає можливість побудови теплової карти результатів, накладеної на філогенетичне дерево досліджених геномів, що, на нашу думку, є оптимальним засобом представлення подібних результатів. Даний інструмент не дозволяє порівнювати одночасно більше 10 геномів, тому довелося обмежитися лише найближчими до досліджуваних нами геномів, виявлених в базі GenBank шляхом повногеномного пошуку за допомогою алгоритму BLAST.

Теплова карта-дендрограма результатів orthoANI, представлена на рисунку 4.13, підтверджує видову ідентифікацію штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559. Згідно критерію orthoANI, два штами вважаються такими, що належать до одного виду, якщо значення даного індексу для пари їх геномів перевищує 95% [74]. Для пари *Bacillus subtilis* ATCC 6051 та *Bacillus subtilis* ONU 559 він дорівнює 98,63%, що значно перевищує значення cutoff-критерію. Показник orthoANI (середня нуклеотидна подібність) між штамами *B. velezensis* ONU 553 та *B. velezensis* FZB42 дорівнює 98,87%, що також перевищує поріг розмежування видів (95%). Для пари штамів *B. megaterium* ONU 554/ *B. pumilus* SB-H9 значення orthoANI становить 95,2%.

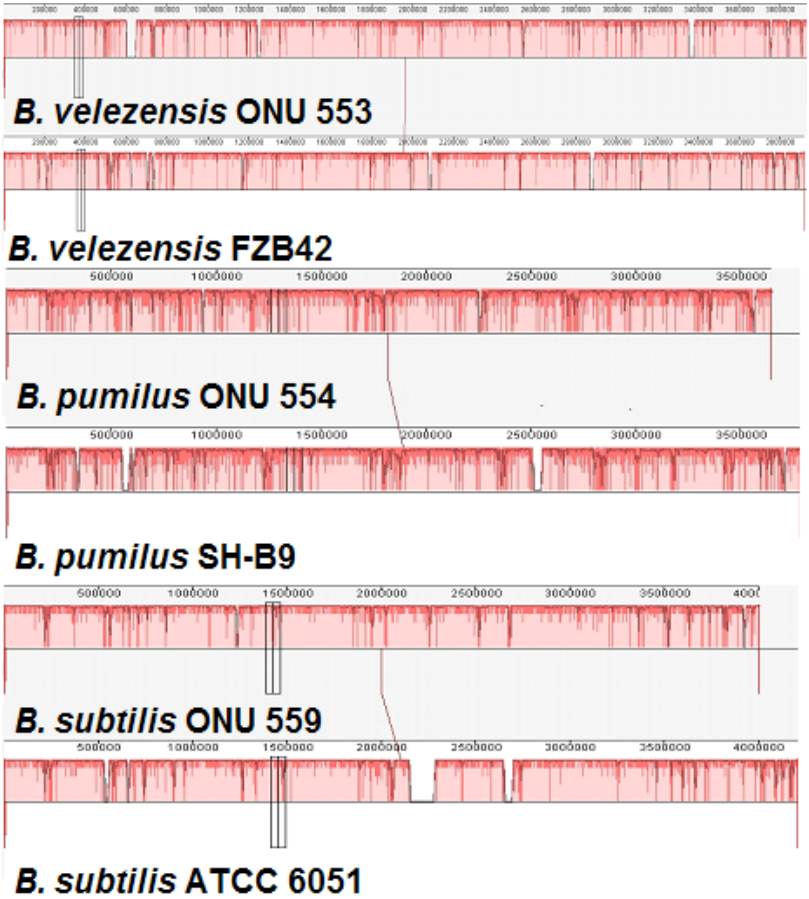

Рис. 4.12. Візуалізація геномів за допомогою Mauve
Примітка: В кожній парі згори розташовано геном бактерій досліджуваного штаму, знизу – референсного

Для всіх геномів було виконано анотування за допомогою сервера PATRIC. Його результати представлені на таблицях та генетичних картах (таблиці 4.14, 4.15; рисунки 4.14, 4.16, 4.19).

Характеристики секвенованих геномів добре укладаються в діапазон значень окремих ознак, властивих відповідним видам. Так, *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559 позбавлені плазмід, що відомо для приблизно 80% штамів цих видів [27, 54],

а штам *B. pumilus* ONU 554 має плазміду, як це характерно для представників виду [48].

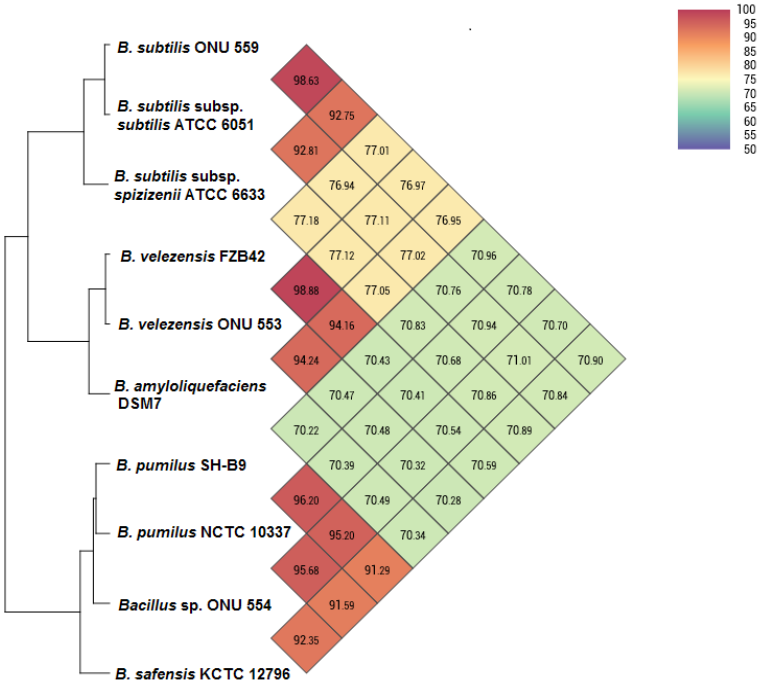

Рис. 4.13. Теплова карта показника orthoANI, обрахованого для сукупності геномів глибоководних споротвірних бактерій досліджених штамів та споріднених до них бактерій

Розміри геномів штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559 потрапляють у властивий цим видам діапазон 3,8-4,2 мегабаз, в обох випадках наближаючись до його верхньої межі (табл. 4.15) [25, 54, 114]. Те ж саме стосується і кількості ВРЗ у геномі (діапазон складає 3600-4000 для *B. velezensis* [54] та 3800-4500 для *B. subtilis* [75]). Провести таке саме порівняння для геному *B. pumilus* ONU 554 важко через відносний брак наявних даних. Можна відмітити схожість даного виду зі штамом *B. pumilus* GR8, який відомий в якості фітопатогену імбиру, по параметрах абсолютного розміру геному, кількості ВРЗ та порівняно з інши-

ми штамами даного виду великій кількості генів рРНК та тРНК (табл. 4.15) [6, 140].

Таблиця 4.14

Функціональні показники геномів

Показник	Кількість ВРЗ		
	***B. velezensis* ONU 553**	***B. pumilus* ONU 554**	***B. subtilis* ONU 559**
Метаболізм	722	628	767
Процесинг білків	221	217	225
Відповідь на стрес, захист, вірулентність	145	131	148
Клітинні процеси	242	211	253
Біоенергетика	212	204	214
Метаболізм ДНК	80	80	87
Метаболізм РНК	52	51	52
Мембранний транспорт	71	76	76
Поверхневий апарат клітини	16	13	26
Регуляція та передача сигналу	10	10	11
Різне	10	8	11

Генералізовані дані протеомної анотації геномів роблять очевидним факт відносної близькості штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559, і певної відокремленості від них штаму *Bacillus pumilus* ONU 554. На жаль, порівняльний аналіз таких даних з іншими штамами даних видів неможливий через недостатню досконалість та стандартизацію методів автоматичного анотування геномів [23, 114]. Даний тренд простежується і на даних базових властивостей геномів. Зокрема, геному *Bacillus pumilus* ONU 554 властивий відносно невеликий розмір, близький до мінімального для бацил. Поєднання цих характеристик робить необхідним виконання додаткових фізіологічних досліджень для остаточної ідентифікації штаму. Можна припустити, що в цьому випадку мова йде про новий вид роду *Bacillus*, близький до

Таблиця 4.15

Базові показники геномів глибоководних споротвірних бактерій

Показник	*B. velezensis* ONU 553	*Bacillus pumilus* ONU 554	*B. subtilis* ONU 559
Розмір геному, п.н.	3 934563	3642544	4 004 302
Вміст ГЦ пар, %	46,69	41,93	43,90
Плазміди	0	1	0
Білок-кодуючі ВРЗ	3953	3749	4084
Гени функціонально анотованих білків	3252	3019	3493
Гени не ідентифікованих білків	701	730	591
Гени тРНК	86	81	87
Гени рРНК	27	24	30
Гени профагів	4	3	2
Повтори	39	57	18

Bacillus pumilus. Для підтвердження цього припущення у подальшому планується провести додаткові дослідження, а тут ми залишаємо його під назвою *Bacillus pumilus* ONU 554 [6].

У результаті проведених досліджень встановлено, що розмір геному бактерій штаму *B. subtilis* ONU 559 дорівнює 4 004 302 пар основ. За даними повногеномних порівнянь штам ідентифіковано як *B. subtilis*, що було відмічено вище.

4.6.2. Характеристика геному штаму *B. subtilis* ONU 559

Цікавою особливістю цього геному є досить значна відмінність у розмірах у порівнянні з геномом типового штаму *B. subtilis* ATCC 6051, який перевищує геном *B. subtilis* ONU 559 на 211 308 пар основ. Даний дефіцит зводиться до ряду відносно нечисленних, проте досить великих, хромосомних делецій, у порівнянні з геномом типового штаму, з наступними координатами (рис. 4.12): 529502-556310 (26,7 кб), 652287-664114 (11,8 кб), 2055867-2071085 (15, 2 кб), 2152085-2286407 (134,3 кб), 2653354-2701339

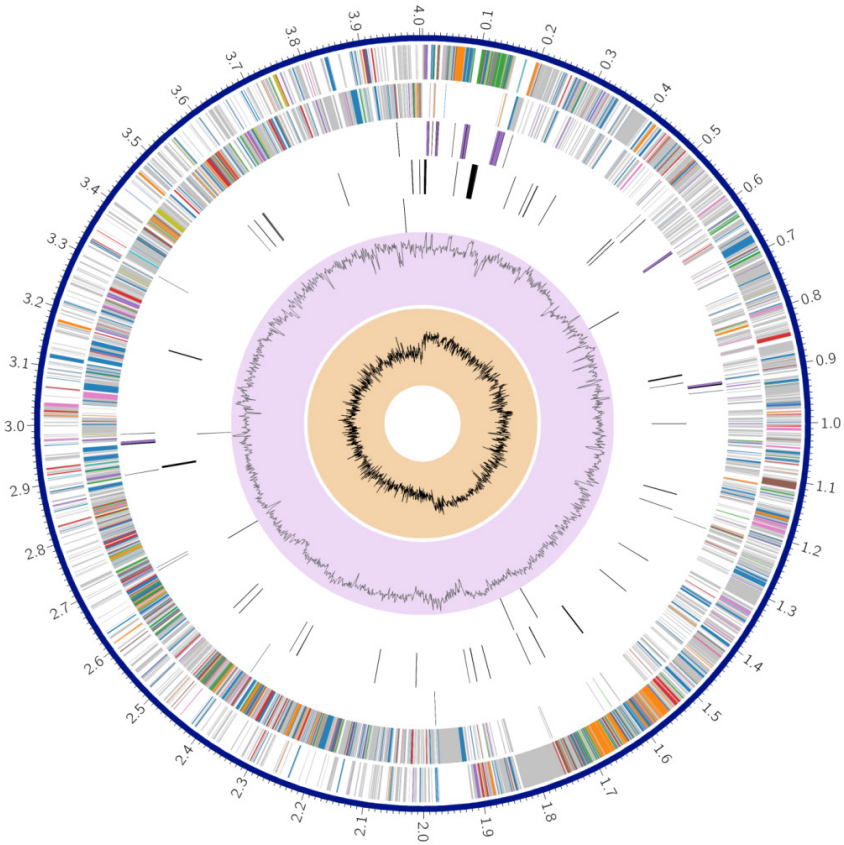

Рис. 4.14. Кільцева карта геному *B. subtilis* ONU 559

Примітка: Ззовні всередину карти: контіг, відкриті рамки зчитування (ВРЗ) на лідируючому ланцюгу, ВРЗ на відстаючому ланцюгу, гени РНК, ВРЗ, що мають гомологію до відомих детермінант антибіотикорезистентності, ВРЗ, що мають гомологію до відомих факторів патогенності, відсоток ГЦ-пар, ГЦ-асиметрія між ланцюгами. Колір лінії відповідає належності відкритої рамки зчитування (ВРЗ) до певної функціональної підсистеми: синій – метаболізм, зелений – процесинг білків, фіолетовий – відповідь на стрес, захист, вірулентність, помаранчевий – клітинні процеси, червоний – біоенергетика, коричневий – метаболізм ДНК, рожевий – мембранний транспорт, сірий – метаболізм РНК, жовтий – поверхневий апарат клітини, голубий – регуляція та передача сигналу, світло-голубий – різне.

(47,9 кб) пар основ. Фрагменти розміром у 134,5 та 47,9 кб відповідають профагам. Але *B. subtilis* ONU 559 має ряд надлишкових фрагментів у геномі у порівнянні з геномом *B. subtilis* ATCC 6051, за координатами: 2521030-2527806 (6,7 кб) та 3717625-3727185 (9,5 кб). Природа цих інсерцій потребує подальшого вивчення. Виявлений системою PHASTER профаг з координатами 1287507-1320920 пар основ ідентичний такому в геномі типового штаму (рис. 4.15). Вміст ГЦ-пар 44,84% у ньому близький до відповідного показника для геному штаму-господаря [15].

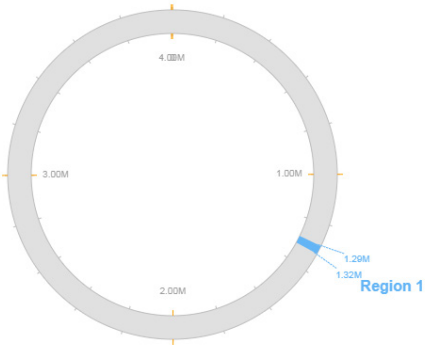

Рис. 4.15. Кільцева карта геному *B. subtilis* ONU 559 з локалізацією профагового елементу, виявленого PHASTER

Набір ідентифікованих за допомогою antiSMASH та Bagel4 генетичних кластерів є досить характерним для цього виду (табл. 4.16). До помітних особливостей можна віднести відсутність детермінанти синтезу характерного для бацил аміноглікозидного антибіотика неотрегалозодіаміну (кластер з п’яти генів).

З використанням сервера PATRIC у геномі досліджуваного штаму виявлено 4 048 відкриті рамки зчитування, з них для 3 493 (86,2%) приписано біологічну функцію, а 591 залишилась не ідентифікованою (рис. 4.14). Визначено 111 генів, що відповідають за РНК, з них генів тРНК - 87, а генів рРНК - 30.

Пошук за допомогою інструменту IslandViewer та VirulenceFinder 2.0 не виявив детермінант патогенності в геномі штаму *B. subtilis* ONU 559, за допомогою ResFinder-3.2 - не

Таблиця 4.16

Локалізація та характеристика кластерів, виявлених у геномі *B. subtilis* ONU 559

Тип кластеру	Локалізація, п.о.		Найбільш схожий відомий кластер	Подібність, %
	з	по		
Бактеріоцин	204348	228805	Субтиломіцин	100
Нерибосомна пептидсинтетаза	358680	421643	Сурфактин	82
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	1114627	1 135140	-	-
Гібридна нерибосомна пептидсинтетаза/ Транс-АТ полікетидсинтетаза	1 734724	1849475	Бацилен	100
Нерибосомна пептидсинтетаза	1905846	1 988168	Фенгіцин	100
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	2 048520	2070418	-	-
Полікетидсинтетаза III типу	2118153	2 159250	-	-
Нерибосомна пептидсинтетаза	3 046755	3096496	Бацилібактин	100
Бактеріоцин	3611368	3 632979	Субтілозин А	100
Інші	3 640075	3681493	Бацілізин	100

виявив детермінант резистентності до бета-лактамів, колістину, фосфоміцину, фузідової кислоти, глікопептидів, нітроімідазолу, оксазолідинону, хлорамфеніколу, хінолонів, ріфампіцину, сульфаніламіду та тріметоприму. Виявлено детермінанти резистентності до аміноглікозидів, макролідів та тетрациклінів. Детермінанта резистентності до аміноглікозидів представлена геном aadK (аміноглікозид 6-аденілілтрансферази, номер доступу до референсу в базі GenBank M26879.1). Його локалізація в хромосомі 2510238-2511090 п.о.; ідентичність гену референсній послідовності складає 98,71%. Детермінанта резистентності до макролідів пред-

ставлена геном mph(K) (макролід фосфотрансферази К), з локалізацією 274663-275583 п.о. та ідентичністю референсу 98,05%. Детермінанта резистентності до тетрацикліну є геном tetBSR, з локалізацією 3977776-3979152 п.о. та ідентичністю до референсу 99,42%. Експериментально резистентність до антибіотиків класів аміноглікозидів (зокрема, стрептоміцину та нетілміцину), як і макролідів (на прикладі ерітроміцину та олеандоміцину) показана не була (табл. 4.9).

4.6.3. Характеристика геному *Bacillus pumilus* ONU 554

Геном *Bacillus pumilus* ONU 554 сягає3642544 пар основ, що на 96,9 кб менше за геном типового штаму. Дана різниця пояснюється наявністю в геномі типового штаму *Bacillus pumilus* SH-B9 наступних інсерцій у порівнянні з геномом *Bacillus* sp. ONU 554 (рис. 4.12): 331019-345833 п.о. (14,8 кб), 548738-579024 п.о. (30,2 кб), 1223547-1231981 п.о. (8,4 кб), 2509952-2550934 п.о. (40,1 кб), 2835168-2838616 п.о. (3,4 кб). Певний надлишок відносно типу скомпенсовано невеликими інсерціями нез'ясованої природи: 854620-862290 п.о. (7,7 кб), 1681273-1686993 п.о. (5,7 кб), 3366808-3376515 п.о. (9,7 кб). Важливою особливістю геному *Bacillus pumilus* ONU 554 є наявність у його складі відносно великої плазміди (табл. 4.15), яка гомологічна плазміді штаму *Bacillus pumilus* SH-B9 [6].

Цікавим є набір біосинтетичних кластерів, наявних у геномі цього штаму (табл. 4.17). По-перше, жоден з виявлених кластерів не є повністю гомологічним до відомих з даних літератури. По-друге, системою Bagel4 ідентифіковано три генетичні детермінанти синтезу різних бактеріоцинів. Один з них – пуміларин – належить до відносно добре охарактеризованої групи циклізованих «голова до хвоста» пептидів, до якої належить інший відомий для бацил бактеріоцин – амілоцикліцин, характерний для бацил підгрупи *Bacillus amyloliquefaciens* [10, 130] та виявлений в іншого досліджуваного штаму– *B. velezensis* ONU 553. Інші два бактеріоцини – клостицин, який раніше був відомий для клостридій [69], та UviB значно менш вивчені [6, 16]. Останній бактеріоцин належить до групи так званих холін-подібних бактеріоцинів.

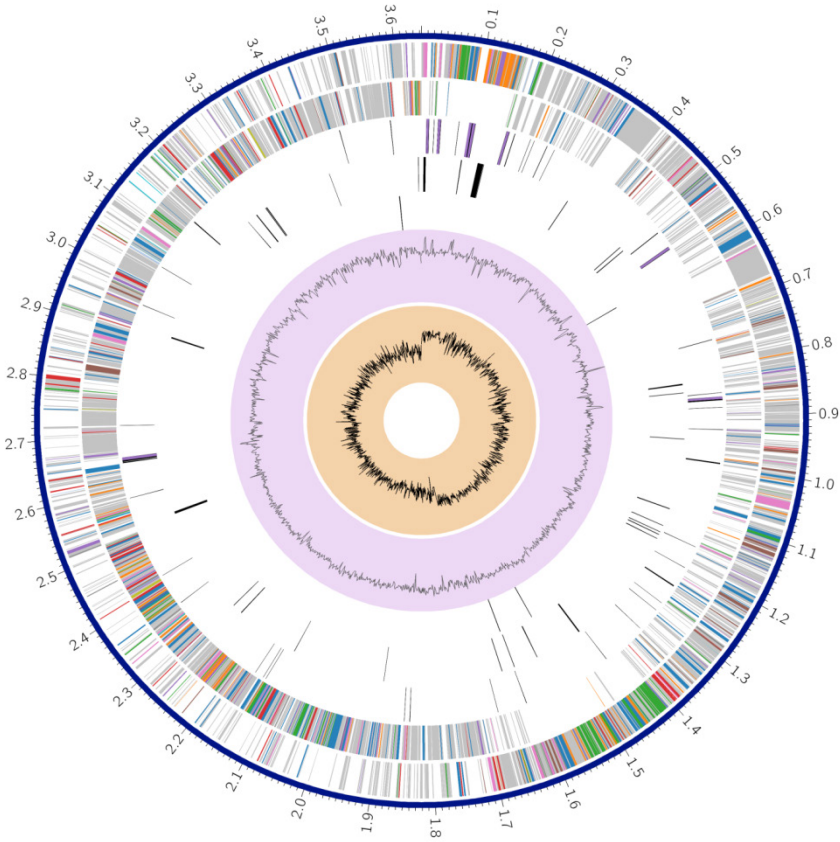

Рис. 4.16. Карта геному *B. pumilus* ONU 554

Примітка: Ззовні всередину карти: контіг, відкриті рамки зчитування (ВРЗ) на лідируючому ланцюгу, ВРЗ на відстаючому ланцюгу, гени РНК, ВРЗ, що мають гомологію до відомих детермінант антибіотикорезистентності, ВРЗ, що мають гомологію до відомих факторів патогенності, відсоток ГЦ-пар, ГЦ-асиметрія між ланцюгами. Колір лінії відповідає належності відкритої рамки зчитування до певної функціональної підсистеми: синій – метаболізм, зелений – процесинг білків, фіолетовий – відповідь на стрес, захист, вірулентність, помаранчевий – клітинні процеси, червоний – біоенергетика, коричневий – метаболізм ДНК, рожевий – мембранний транспорт, сірий – метаболізм РНК, жовтий – поверхневий апарат клітини, голубий – регуляція та передача сигналу, світло-голубий – різне.

Таблиця 4.17

Характеристики та локалізація кластерів, виявлених у геномі *Bacillus pumilus* ONU 554

Тип кластеру	Локалізація, п.о.		Найбільш схожий відомий кластер	Подібність, %
	з	по		
Нерибосомна пептидсинтетаза	334174	416332	Ліхенізин	85
Нерибосомна пептидсинтетаза, полікетидсинтетаза 1 типу.	618110	698411	Цвіттерміцин	18
Ферменти біосинтезу терпеноїдів та сидерофорів	1051156	1,079,477	Каротиноїд	50
Беталактон	1 752368	1 780023	Фенгіцин	50
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	1847856	1868573	-	-
Полікетидсинтетаза 3 типу.	1 906917	1 948017	-	-
Бактеріоцин	2257590	2267916	Пумілярин	-
Беталактон	2 394071	2 426376	-	-
Бактеріоцин	2713932	2734121	UviB	-
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	2963108	2984028	Субтілин	23
Інші	3307316	3348737	Бацилізин	85
Бактеріоцин	3293027	3313906	Клостіцин	-
Нерибосомна пептидсинтетаза	3 576143	3 625851	Бацилібактин	55

Холін-подібні бактеріоцини отримали свою назву завдяки подібності первинної структури та властивостей до специфічних фагових білків – холінів, які перфорують мембрану бактеріальної клітини на пізніх стадіях інфекції та сприяють її руйнуванню, в тому числі забезпечуючи вихід фагових лізоцимів назовні клітини.

Усі виявлені у геномі даного штаму профаги також властиві типовому штаму (рис. 4.17, 4.18; табл. 4.18). Цікаво, що один з профаг-подібних елементів, щоправда, досить сильно деградований, розташований на плазміді (табл. 4.15, рядок 3; табл. 4.18, рядок 3).

Таблиця 4.18

Профагові елементи, виявлені у геномі *Bacillus pumilus* ONU 554

Профаг	Розмір (кб)	Кількість білок-кодуючих ВРЗ	Локалізація профагового елементу, п.о.		ГЦ пар, %
			з	по	
1	47,7	65	2671911	2719632	39,61
2	41,7	36	2707120	2748899	39,90
Профаг плазміди	6,5	13	64616	71128	37,92

З використанням сервера PATRIC у геномі досліджуваного штаму виявлено 3 749 відкриті рамки зчитування, з них для 3 019 (80,5%) приписано біологічну функцію, а 730 залишилась не ідентифікованими. Визначено також 105 генів РНК, з них генів тРНК - 81, а генів рРНК - 24.

Пошук за допомогою інструмента IslandViewer та VirulenceFinder 2.0 не виявив детермінант патогенності в геномах штамів *B. pumilus* ONU 554, за допомогою ResFinder-3.2 - не виявив детермінант резистентності до аміноглікозидів, бета-лактамів, колістину, фосфоміцину, фузідової кислоти, глікопептидів, макролідів, нітроімідазолу, оксазолідинону, хінолонів, ріфампі-

цину, сульфаніламіду, тетрацикліну та тріметоприму. Виявлено детермінанту резистентності до хлорамфеніколу – ген cat-86 (хлорамфенікол-ацетилтрансферазу, номер доступу до референсу в базі Genbank K00544.1).

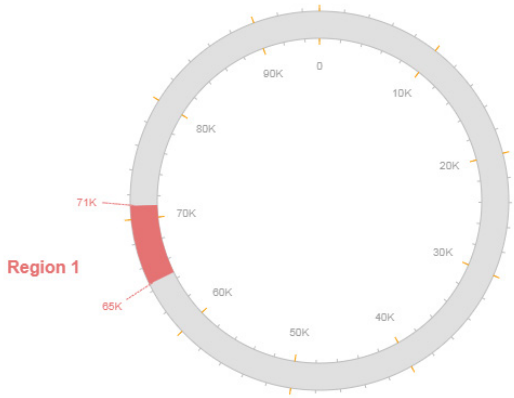

Рис. 4.17. Карта плазміди *Bacillus pumilus* ONU 554 з локалізацією профагового елемента, виявленого PHASTER

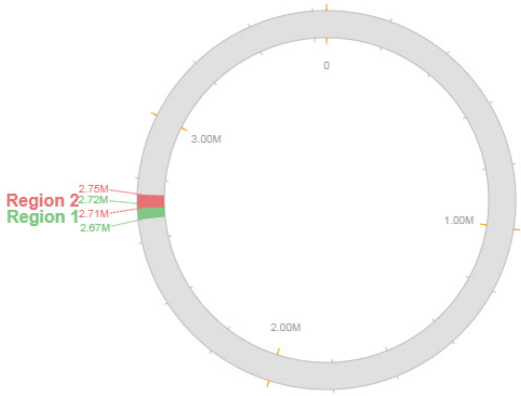

Рис. 4.18. Карта хромосоми *Bacillus pumilus* ONU 554 з локалізацією профагових елементів, виявлених PHASTER

Його локалізація в хромосомі 1163650-1164311 пар основ; ідентичність гену референтній послідовності складає 93,2%. Експериментально наявність резистентності до хлорамфеніколу в цього штаму показана не була (табл. 4.9) [6].

4.6.4. Характеристика геному *B. velezensis* ONU 553

Геном бактерій *B. velezensis* ONU553, як і у попередніх штамів, представлено кільцевою хромосомою, розмір якої дорівнює 3 934 563 пар нуклеотидів, що приблизно на 16 кб більше, ніж у штаму *B. velezensis* FZB42 (рис. 4.12). Порівняльний аналіз геномів даних штамів показав, що перша інсерція в районі 599372-645952 п.о. розміром 46 кб і містить деякі фаг-специфічні білки. Це та дані PHASTER (див. табл. 4.20, рядок 1) доказує, що даний фрагмент належить профагу. Друга інсерція, розміром 27 кб, з координатами 3351458-3378255 п.о., містить полікетидсинтетазний кластер. Локалізація даного кластеру приблизно відповідає початку виявленого, але не ідентифікованого системою antiSMASH кластера (табл. 4.19). Вище відмічений надлишок генетичного матеріалу частково скомпенсовано великою кількістю малих інсерцій IS-елементів у геномі *Bacillus velezensis* FZB42 [114].

З використанням сервера PATRIC у геномі досліджуваного штаму виявлено 3 953 відкриті рамки зчитування, з них для 3 252 (82%) приписано біологічну функцію, а 701 залишилась не ідентифікованою (рис. 4.19). Визначено також 113 генів, відповідальних за РНК, з них генів тРНК - 86, а генів рРНК - 27.

Пошук бактеріоцинів за допомогою системи Bagel4 виявив генетичні кластери, що відповідають за синтез двох сполук – LCI-подібного бактеріоцину та амілоцикліцину (табл. 4.19). Ці бактеріоцини належать до таких, що вже відомі для *B. velezensis*. Перший належить до відносно слабко охарактеризованої групи LCI-подібних бактеріоцинів. Прототиповий білок даної групи (LCI) відомий активністю по відношенню до *Xantomonas campestris* pv. *oryzae*, важливого патогену рослин рису [78]. Другий відноситься до групи циклізованих «голова до хвоста» бактеріоцинів та характерний саме для групи видів *B. amyloliquefaciens* [10, 111, 114].

Таблиця 4.19

Характеристики кластерів, виявлених у геномі *B. velezensis* ONU 553

Тип кластера	Локалізація, п.о.		Найбільш схожий відомий кластер	Подібність, %
	з	по		
Бактеріоцин	299924	300217	LCI	-
Нерибосомна пептидсинтетаза	311 938	376 796	Сурфактин	91
Полікетидсинтетаза	956 092	997 336	Бутірозин	7
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	1084807	1 101975	-	-
Транс-АТ полікетидсинтетаза	1 406685	1 494504	Макролактин	100
Гібриднанерибосомна пептидсинтетаза/ Транс-АТ полікетисинтетаза	1717970	1,827173	Бацилен	100
Нерибосомна пептидсинтетаза	1 884833	2 021950	Фенгіцин	100
Ферменти біосинтезу терпеноїдів	2044982	2066865	-	-
Полікетидсинтетаза III типу	2 117302	2,158,402	-	-
Транс-АТ полікетисинтетаза	2274263	2380436	Дифіцидин	100
Бактеріоцин	3052374	3049942	Амілоцикліцин	-
Нерибосомна пептидсинтетаза	3003787	3054939	Бацилібактин	100
Нерибосомна пептидсинтетаза	3 337057	3 397053	-	-
Інші	3599120	3640538	Бацилізин	100

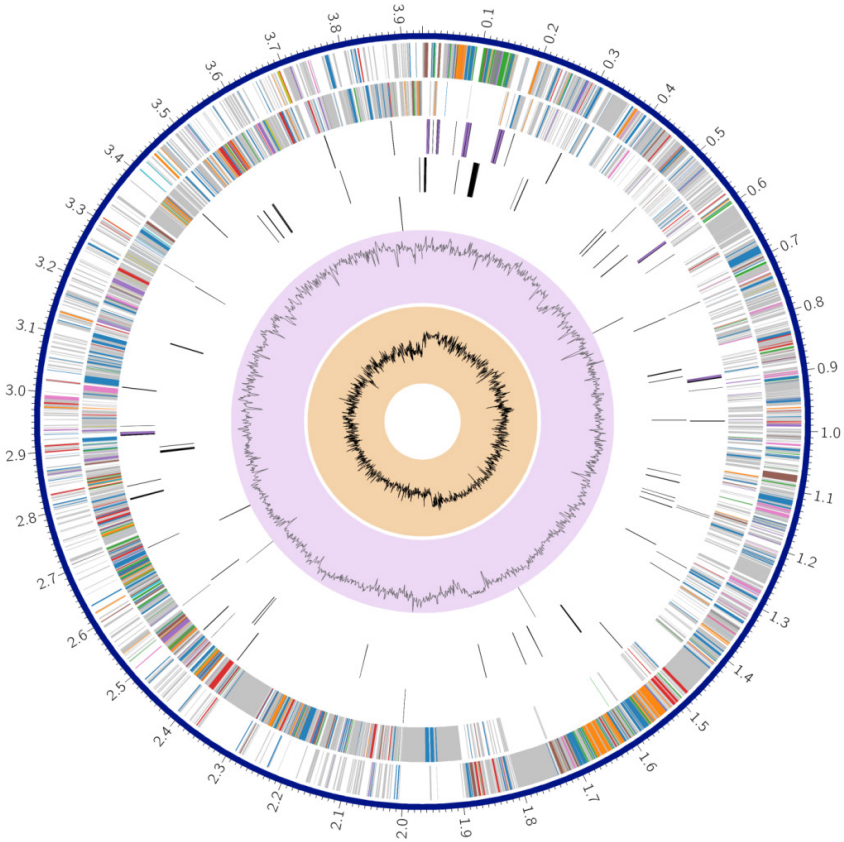

Рис. 4.19. Кільцева карта геному *B.velezensis* ONU 553

Примітка: Ззовні всередину карти: контіг, відкриті рамки зчитування (ВРЗ) на лідируючому ланцюгу, ВРЗ на відстаючому ланцюгу, гени РНК, ВРЗ, що мають гомологію до відомих детермінант антибіотикорезистентності, ВРЗ, що мають гомологію до відомих факторів патогенності, відсоток ГЦ-пар, ГЦ-асиметрія між ланцюгами. Колір лінії відповідає належності відкритої рамки зчитування до певної функціональної підсистеми: синій – метаболізм, зелений – процесинг білків, фіолетовий – відповідь на стрес, захист, вірулентність, помаранчевий – клітинні процеси, червоний – біоенергетика, коричневий – метаболізм ДНК, рожевий – мембранний транспорт, сірий – метаболізм РНК, жовтий – поверхневий апарат клітини, голубий – регуляція та передача сигналу, світло-голубий – різне.

Пошук біологічно активних вторинних метаболітів за допомогою системи antiSMASH виявив 12 кластерів, з яких лише 4 виявилися без відомих гомологів.

З достовірно ідентифікованих кластерів (що відповідає значенню індексу схожості 100%) виявлено функціональні кластери полікетидів – макролактину та дифіцидину, і бацилену, який звичайно також класифікується як полікетид, але синтезується гібридною полікетид-поліпептидсинтетазою [114, 144] (табл. 4.19).

Дані сполуки демонструють бактерицидну активність по відношенню до патогенів людини групи ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) та бактеріальних фітопатогенів; макролактини також демонструють здатність пригнічувати проліферацію клітин меланоми миші та реплікацію вірусу простого герпесу та імунодефіциту людини у лімфобластах [144]. Через свою низьку стабільність вони досі не дійшли до стадії клінічних випробувань, хоча можуть бути перспективними сполуками-лідерами для драг-дизайну [145]. На жаль, на даному етапі досліджень технічно не можливо з'ясувати, які саме варіанти макролактину та дифіцидину синтезує *B. velezensis* ONU 553. Ця проблема може бути вирішена шляхом біохімічних досліджень чи з використання більш просунутих біонформатичних засобів ніж сучасні.

Також виявлено кластери нерибосомного антибіотика фенгіцину, дипептиду бацилізину та сидерофору бацилібактину. З дещо меншою достовірністю ідентифіковано кластер сурфактину (91% подібності) та з дуже низькою – специфічного для бацил аміноглікозидного антибіотика бутірозину (7% подібності).

Пошук за допомогою інструмента IslandViewer та VirulenceFinder 2.0 не виявив детермінант патогенності. Проведений аналіз за допомогою ResFinder-3.2 не виявив детермінант резистентності до оксазолідинону, фосфоміцину, нітроімідазолу, сульфаніламіду, аміноглікозидів, макролідів, глікопептидів, колістину, фузідової кислоти, феніколу, хінолонів, ріфампіцину, тріметоприму, бета-лактамів та тетрацикліну. Ці дані підтверджують безпеку потенційного використання даного штаму у біотехнології. Втім, варто мати на увазі, що даний штам мав найбільшу ре-

зистентність до тетрацикліну (табл. 4.9). Така ситуація є, протилежною тій, що спостерігається для двох інших штамів.

З чотирьох не ідентифікованих біосинтетичних кластерів два належать до терпен синтезуючих ферментних комплексів, один відповідає не ідентифікованій нерибосомній пептидсинтетазі, а інший – не ідентифікованій полікетидсинтетазі третього типу.

Таблиця 4.20

Профагові елементи, виявлені у геномі *B. velezensis* ONU 553

Розмір (кб)	Кількість білок-кодуючих ВРЗ	Локалізація профагового елементу		ГЦ пар, %
		з	по	
54,1	73	597321	651509	43,18
9,9	15	1168469	1178415	45,75
31,7	43	1229431	1261224	46,97
24,8	10	1841385	1866281	41,21

Пошук профагових елементів за допомогою сервера FASTER виявив чотири профаги. Їх локалізація, розмір та інші параметри яких вказані у таблиці 18. Цікаво, що всі виявлені профаги локалізовані в тому самому репліхорі (рис. 4.20).

Проведене секвенування та аналіз структури геному досліджуваного штаму підтвердили попередню ідентифікацію його за спектром жирних кислот з точністю до підгрупи *B. amyloliquefaciens.* Геном дослідженого штаму демонструє наявність п’яти найбільш характерних для даного виду біосинтетичних кластерів – таких, що відповідають за синтез антимікробних сполук фенгіцину, сурфактину, бациліну, бацилізину та сидерофору бацилібактину. Наявність даних кластерів характерна для переважної більшості відомих штамів *B. velezensis*[114].

Також наявні детермінанти біосинтезу макролактину та дифіцидину, лише трохи менш поширені (відсутні в одному штамі з 105) [115]. З семи відомих для даного виду бактеріоцинів - субті-

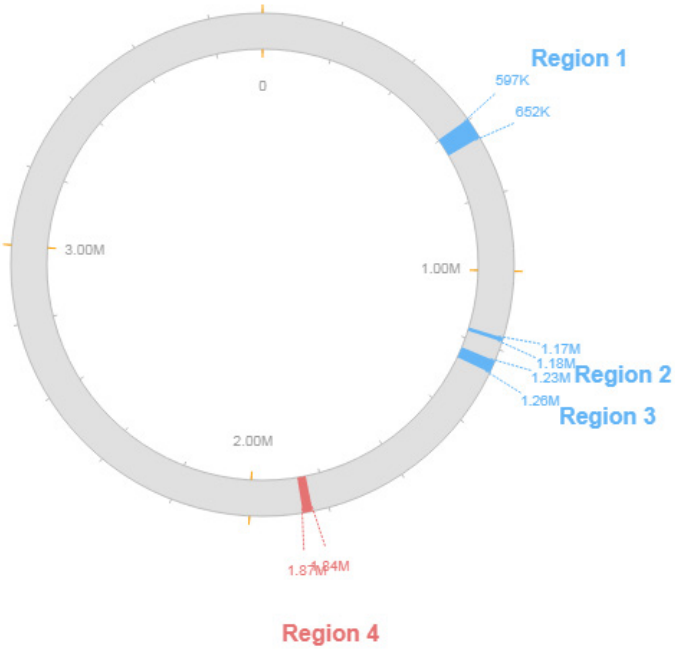

Рис. 4.20. Кільцева карта геному *B. velezensis* ONU 553 з локалізацією профагових елементів, виявлених PHASTER

лін, мерсацидин, бациломіцин, плантазоліцин, лоциломіцин, аміноцикліцин та LCI - виявлено лише два останніх, які відомі переважно для виду *B. amyloliquefaciens* та ряду видів групи *Bacillus subtilis*, відповідно [115]. Бактеріоцин LCI взагалі є таким, що входить до корового геному *B. velezensis* [29, 114].

Отримані дані в цілому узгоджуються з наявною у літературі інформацією про особливості геномів представників виду *B. velezensis* [29], а 14 виявлених біосинтетичних кластерів підтверджують уявлення про цей вид як найбільш біосинтетично активний серед усіх інших представників підгрупи *B. amyloliquefaciens* [49]. Відомо, що у ряду штамів даного виду гени так званих вторинних метаболітів складають в середньому до 8% геному, що майже вдвічі перевищує аналогічний показник для *B. subtilis* [77]. Бактерії цього виду часто асоційовані з

рослинами та за своєю екофізіологією виділяються у категорію ризобактерій, що сприяють росту рослин (plant growth promoting rhizobacteria). До факторів такої біологічної активності належать антимікробні сполуки, що синтезуються бактеріями цього виду та часто мають активність по відношенню до бактеріальних та грибкових фітопатогенів [50, 83].

Не ідентифіковані, але виявлені antiSMASH генетичні кластери потребують подальшого вивчення методами молекулярної біології та біохімії, оскільки можуть відповідати за синтез раніше невідомих біологічно активних сполук.

Штами *B. velezensis* ONU 553, *B. subtilis* ONU 559 та *B. pumilus* ONU 554 задепоновано у Колекції морських та практично корисних мікроорганізмів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, а штам *B. velezensis* ONU 553 задепоновано в Депозитарії мікроорганізмів ІМВ НАНУ. Секвеновані геноми зберігаються у базі GenBank під номерами, відповідно, CP043416, CP060417 та CP060799. Плазміду pONU554 задепоновано у GenBank під номером CP060800.

4.7. Характеристика екзометаболомів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554, *B. subtilis* ONU 559

З використанням рідинної хромато-мас-спектрометрії у бактерій штамів *Bacillus velezensis* ONU 553 виявлено та ідентифіковано 90 метаболітів, *Bacillus pumilus* ONU 554 – 33 та *Bacillus subtilis* ONU 559 - 43. Знайдені в екзометаболомі сполуки можна поділити на дві групи: такі, що вже відомі для представників роду *Bacillus*, та нові, як для даного роду, так і для прокаріот взагалі. Сполуки другої групи підлягають подальшому вивченню та ідентифікації. Аналіз метаболомів було виконано в співставленні з геномними даними [95, 127].

Серед вторинних метаболітів досліджуваних штамів виявлено варіанти найбільш вивченого класу нерибосомних пептидів – сурфактинів (табл. 4.21, 4.22, 4.23). Метаболіти цього класу відомі у представників *B. velezensis*, *B. pumilus* та *B. subtilis* [50, 66, 145], що підтверджується також нашими результатами. Сурфактини – ацильовані циклічні нерибосомні гептапептиди з сильною поверхневою активністю, а також гемолітичними та антимікроб-

ними (бактеріостатичними та фунгіцидними) властивостями [30]. Для них властивий структурний патерн GluLeuLeu^{d} (Val/Ala/Iso) AspLeu^{d}Leu, у якого кільце замикається через β-гідрокси жирну кислоту з довжиною ланцюжка в діапазоні 11-14 атомів. Для підгрупи ліхенізинів характерна заміна глутамінової кислоти на глутамін; крім того, у них значно частіше ніж у класичних сурфактинів зустрічаються заміни лейцину в положеннях 2 та 7 на ізолейцин. Відомо, що поверхнева активність ліхенізину вища, ніж у сурфактину [30]. Взагалі слід відзначити, що біологічна активність численних варіантів сурфактину на сьогодні вивчена слабко.

Структура генетичного кластеру сурфактинів, напроти відома дуже добре. До нього входять три гени субодиниць нерибосомної поліпептидсинтетази (*srfAA*, *sfrAB*, *srfAC*), та низка відносно малих допоміжних відкритих рамок зчитування (ВРЗ), зокрема обов'язкова для полікетидсинтетаз і нерибосомних пептидсинтетаз фосфопантетенілтрансфераза [30, 95].

У досліджених в роботі бактерій виявлено такі сполуки, як антеізо-С16-сурфактин, сурфактин В2 1-Ме естер і т.д. Всі ці сполуки відомі для представників групи *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* та інш.) [30, 66]. Простежується певна видоспецифічність – так, описані у свій час як «пумілацидини» варіанти сурфактинів з кінцевим валіном (пумілацидини B, D, F та G) та ізолейцином (пумілацидини A, C та E) виявлені у бактерій штаму *B. pumilus* ONU 554 (табл. 20). Аналіз геному даного штаму з використанням PRISM 3 виявив наявність генетичного кластеру, що кодує білки НРПС, модульний склад якого відповідає послідовності компонентів пумілацидинів A, C та E. Таким чином, можна казати про ідентифікацію кластеру пумілацидину, яка виконана вперше (рис. 4.21) [95].

Штами *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU559 є найбільш подібними за спектрами метаболітів. Зокрема, їх об'єднує наявність сполук класу фенгіцинів: пліпастатинів, фенгіцинів в узькому розумінні та аграстатинів (табл. 4.21, 4.23). Фенгіцини є декапептидами, на відміну від сурфактинів. Важливо відмітити, що поверхнево-активні та бактерицидні властивості фенгіцин-подібних речовин виражені слабше, ніж у сурфактинів. Відмінності

Таблиця 4.21

Екзометаболіти *Bacillus velezensis* ONU 553

M[1]	Назва[2]	Обрахована маса[3]	Біологічне джерело[4]	Використання / важливість[4]
1	2	3	4	5
1490,827914	Пліпастатин B1.	1490,827238	*Bacillus cereus*	Інгібітор фосфоліпази
1476,815714	Пліпастатин A2.	1476,811588	*Bacillus cereus*	Інгібітор фосфоліпази
1504,848514	Пліпастатин B2.	1504,842888	*Bacillus cereus*	Інгібітор фосфоліпази
1448,783354	Аграстатин A	1448,780288	*Bacillus subtilis*	Антифунгальний агент,активний проти багатьох фітопатогенів
1476,817244	Не відома	1476,811588	*Bacillus cereus*	Інгібітор фосфоліпази
1462,803854	Пліпастатин A1. Фенгіцин IX	1462,795938	*Bacillus cereus* *Bacillus subtilis*	Інгібітор фосфоліпази
1476,814834	Невідома	1476,811588	*Bacillus cereus*	Інгібітор фосфоліпази
993,637664	4-L-Аланінсурфактин B2	993,636188	*Bacillus subtilis*	Невідомі
1021,668224	ai-C14-сурфактин	1021,667488	*Bacillus licheniformis*	Невідомі
1007,653654	Гагеостатин C	1007,65183	*Bacillus subtilis*	Демонструє високу антифунгальну активність та цитотоксичність
1039,682324	Гагеостатин A	1039,678053	*Bacillus subtilis*	Демонструє високу антифунгальну активність та цитотоксичність
1053,698034	Гагеостатин B	1053,693703	*Bacillus subtilis*	Демонструє високу антифунгальну активність та цитотоксичність

Продовження таблиці

1	2	3	4	5
993,637754	4-L-Аланінсурфактин B1	993,636188	*Bacillus subtilis*	Сурфактант
1035,687124	Сурфактин 1	1035,683138	*Bacillus amyloliquefaciens*	Сурфактант,фібринолітик, протизапальний агент, антикоагулянт
1021,669474	Сурфактин	1021,667488	*Bacillus licheniformis*	Сурфактант,фібринолітик, протизапальний агент, антикоагулянт
1049,701824	ai-C16-сурфактин	1049,698788	*Bacillus licheniformis*	Циклічний, Ліпопептид
1035,682834	Сурфактин B2 1-Me естер	1035,683138	*Bacillus pumilus*	Сурфактант, фібринолітик, протизапальний агент, антикоагулянт
1049,700514	Сурфактин C2 1-Me естер	1049,698788	*Bacillus pumilus*	Сурфактант, фібринолітик, протизапальний агент, антикоагулянт
1063,717504	Ліподепсипептиди	1063,714438	*Bacillus pumilus*	Комплекс Ліподепсипептидних антибіотиків близьких до сурфактину та бацирцину

Примітка: 1 – Молекулярна маса сполуки, ідентифікована в даному дослідженні; 2 – назва ідентифікованої сполуки; 3 – Молекулярна маса ідентифікованої сполуки згідно базі даних LC-MS приладу; 4 – джерело та характеристики ідентифікованих сполук згідно базі даних приладу LC-MS (DictionaryofNaturalProducts, CRCPress).

Таблиця 4.22

Екзометаболіти *Bacillus pumilus* ONU 554

M[1]	Назва[2]	Обрахована маса[3]	Біологічне джерело[4]	Використання / Важливість[4]
1035,685954	Сурфактин С	1035,683138	*Bacillus subtilis* *Bacillus natto*	Демонструє цитолітичну та поверхневу активність,є сильним інгібітором тромбоутворення.
1049,701784	Сурфактин С2 1-Ме естер	1049,698788	*Bacillus pumilus*	Фібрінолітик, протизапальний агент, антикоагулянт.
1063,716334	Пумілацидин D	1063,714438	*Bacillus* sp. *Bacillus pumilus*	Інгібітор фосфоліпази А2, противірусний агент.
1077,733354	Пумілацидин С	1077,730088	*Bacillus* sp. *Bacillus pumilus*	Інгібітор фосфоліпази А2, противірусний агент.
423,201684	Антибіотик AI 77A	423,200552	*Bacillus pumilus*	Активний проти бактерій та пухлинних клітин, захищає від стрес-індукованих виразок, демонструє протизапальні та протихолестеричні властивості, близький до амікумацинів.
300,205144	Ліпоамід А	300,204908	*Bacillus pumilus*	Невідомі
1021,671364	Сурфактин 7-L-Валінсурфактин С1 Ліпобацилін	1021,667488	*Bacillus subtilis* *Bacillus pumilus*	Невідомі
1035,688144	Сурфактин В2 1-Ме эфір	035,683138	*Bacillus pumilus*	Сурфактант, фібринолітик, протизапальний агент, антикоагулянт

Примітка: 1 – Молекулярна маса сполуки, ідентифікована в даному дослідженні; 2 – назва ідентифікованої сполуки; 3 – Молекулярна маса ідентифікованої сполуки згідно базі даних LC-MS приладу; 4 – джерело та характеристики ідентифікованих сполук згідно базі даних приладу LC-MS (DictionaryofNaturalProducts, CRCPress).

Таблиця 4.23

Екзометаболіти *Bacillus subtilis* ONU 559

M[1]	Назва[2]	Обрахована маса[3]	Біологічне джерело[4]	Використання / Важливість[4]
1488,853264	SNA 60-367-23.	1488,847973	*Bacillus* sp.	Комплекс ліподепсипептидів
1474,837954	SNA 60-367-17.	1474,832323	*Bacillus* sp.	Комплекс ліподепсипептидів
529,290334	Гліцилпроліл-фенілаланіл-пролілізолейцин	529,290035	*Bacillus subtilis*	Інгбітор діпептіділ карбоксипептидази
1476,816594	Пліпастатин А2	1476,811588	*Bacillus cereus*	Інгібітор Фосфоліпази
1462,802674	Пліпастатин А1 Фенгіцин IX	1462,795938	*Bacillus cereus*	Інгібітор Фосфоліпази
1490,832564	Пліпастатин В1	1490,827238	*Bacillus cereus*	Інгібітор Фосфоліпази
1504,847384	Пліпастатин В2	1504,842888	*Bacillus cereus*	Інгібітор Фосфоліпази
1448,783754	Аграстатин А	1448,780288	*Bacillus subtilis*	Антифунгальний агент, активний проти багатьох фітопатогенів
1007,650294	Невідома	1007,651838	*Bacillus subtilis*	Демонструє високу Антифунгальну активність та цитотоксичність
1021,660214	Бамілоцин А	1021,649728	*Bacillus amyloliquefaciens*	Полідепсипептид, близький до сурфактину
1035,676354	Сурфактин 1	1035,683138	*Bacillus amyloliquefaciens*	Сурфактант, фібринолітик, протизапальний агент, антикоагулянт
1049,703814	ai-C16-Сурфактин	1049,698788	*Bacillus licheniformis*	Циклічний Ліпопептид

Примітка: 1 – Молекулярна маса сполуки, ідентифікована в даному дослідженні; 2 – назва ідентифікованої сполуки; 3 – Молекулярна маса ідентифікованої сполуки згідно базі даних LC-MS приладу; 4 – джерело та характеристики ідентифікованих сполук згідно базі даних приладу LC-MS (Dictionary of Natural Products, CRC Press).

фенгіцинів у вузькому розумінні від пліпастатинів полягають у хіральній конформації двох залишків тирозину (4 та 10) у циклі. Аграстатини від пліпастатинів, у свою чергу, відрізняються наявністю у структурі залишку β-гідрокси-, а не аміножирної, кислоти [95, 97].

У штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* ONU 559 виявлено (табл. 4.21, 4.23) відомі для *Bacillus cereus* та *Bacillus subtilis* пліпастатини A1, A2, B1, B2 [94], які є інгібіторами фосфоліпаз. Детектований системою фенгіцин IX є похідним пліпастатину A1 та відрізняється від останнього відсутністю зв'язаного йону K^+ [60]. Також у цих штамів було виявлено аграстатин A (джерело *Bacillus subtilis* [97]) - антифунгальний агент, активний проти багатьох фітопатогенів. Ліподепсипептиди SNA 60-367-17 і SNA 60-367-23 виявлено лише у штаму *B. subtilis* ONU 559. Вони є погано охарактеризованими ліпопептидами, що відомі для *Bacillus* sp., та відрізняються між собою лише типом жирної кислоті. Для них відома здатність до інгібування ароматаз [18].

Геномні дослідження підтверджують наявність біосинтетичних кластерів, подібних до кластеру сурфактину та фенгіцину, в усіх досліджених штамів.

Цікавим є питання про здатність до детермінації синтезу різних сполук одним і тим самим генетичним кластером. Найвірогідніше вирішення даної проблеми полягає у відомому явищі domain skipping (що можна перекласти як «пропущення доменів»), яке призводить до утворення молекул, «оброблених» різними наборами доменів на одній синтетазі [95, 134].

У бактерій *Bacillus velezensis* ONU 553 виявлено також три типи гагеостатинів - A, B, C (табл. 4.21). Дані сполуки мають однаковий пептидний скелет та відрізняються жирнокислотними залишками на N-кінці, набір яких у нерибосомних пептидів звичайно визначається специфічністю тіоестеразного домену. Сама наявність гагеостатинів у дослідженого штаму є проблематичною для пояснення, оскільки генетичного кластера з полікетидсинтетазних доменів, який міг би їх синтезувати в геномі даного виду не виявлено. Гагеостатини раніше були виявлені лише в одного штаму *Bacillus subtilis* 109GGC020, ізольованого з Південно-китайського моря [125]. Це лінійні ліпопептиди, механізм біосинте-

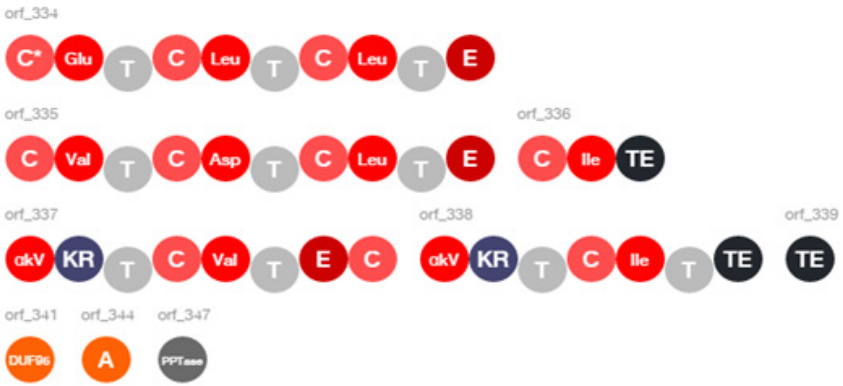

Рис. 4.21. Доменна структура продуктів кластера пумілацидину з геному *Bacillus pumilus* ONU 554, виявлена PRISM 3

Примітка: C – конденсаційні домени; T – тіолюючі домени, TE – тіостеразні домени,KR - кеторедуктазний домен. Комбінаціями літер позначено амінокислоти, за активацію яких відповідає відповідний аденілюючий домен

зу яких ще не встановлено, але з самого початку виглядає ймовірним припущення про те, що це класичний нерибосомний пептид, проте генетичний кластер, який міг би відповідати за їх біосинтез, не виявлено. Підкреслимо той факт, що дані сполуки було попередньо виявлено у штаму морського походження близького виду. У штаму *Bacillus subtilis* 109GGC020 було також описано ще два типи антимікробних пептидів – гагеобактини та гагеотетрини, але вони виявлені не були.

Виходячи з значної структурної подібності, можна зробити обережне припущення щодо синтезу гагеостатинів на синтетазі сурфактину з пропущенням етапів епімеризації для відповідних залишків лейцину та фінальним приєднанням жирної кислоти без циклізації продукту.

Нами проведено порівняльний аналіз доменного складу сурфактин-подібного кластеру штаму *B. velezensis* ONU 553 (рис. 4.22) та показано, що розмір та розташування доменів у даного кластеру та еталонного кластеру біосинтезу сурфактину не відрізняються [95].

Рис. 4.22. Порівняння кластера з геному *Bacillus velezensis* ONU 553 (внизу) з експериментально верифікованим кластером сурфактину (вгорі) [67]

Примітка: Різними кольорами позначено домени відповідного типу: світло-коричневий – конденсаційні домени; блакитним та червоним – N та C кінцеві домени аденілюючого комплексу; зеленим – домен тіолювання, темно-рожевий – тіоестеразний домен

Ще однією загадковою знахідкою став пентапептид GPFPI (інгібітор дипептидил карбоксипептидаз, відомий для *Bacillus subtilis*) (табл. 4.23). Ця відносно маловивчена сполука, була відкрита у 1992 році [91]. Вона може являти собою як побічний продукт метаболізму, наприклад, бути залишком сигнального пептиду, чи являти собою феромон. Прямий пошук даного олігопептиду у геномі виявив, що такий пентапептид є частиною гіпотетичного пептиду YvkN, довжина якого складає 76 амінокислотних залишків. Даний пептид входить до кластеру з трьома не ідентифікованими мембранними пептидами та одним не ідентифікованим не мембранним (табл. 4.24). Можна припустити, що серед даних пептидів є такі, що забезпечують процесинг пропептиду з утворенням декретованого пентапептиду та його транспорт. Пошук за допомогою SignalIP 5.0 не детектує у нього жодних секреторних сигналів [95].

Таблиця 4.24

Геномний контекст гену пептиду YvkN, що гіпотетично містить секретований пептид GPFPI

Початок, п.о.	Кінець, п.о.	Ланцюжок	Ідентифікація ВРЗ
3387246	3383377	-	Гіпотетичний білок
3387805	3387446	-	Гіпотетичний мембранний білок YvlD
3388004	3387807	-	Гіпотетичний мембранний білок YvlC
3389106	3388009	-	Гіпотетичний білок YvlB
3389457	3389131	-	Гіпотетичний мембранний білок YvlA
3389675	3389905	+	YvkN
3390943	3390104	-	Білок джгутика FlaA

Значно більш своєрідним у біохімічному плані є штам *Bacillus pumilus* ONU 554 (табл. 4.22). Про наявність у складі його екзометаболому пумілацидинів С і Д вже було згадано. Геномний майнинг дозволив ідентифікувати генний кластер, який кодує НРПС даного ліпопептиду (рис. 4.21).

Значно менше вивчена сполука - ліпоамід А, яка також була виявлена у *Bacillus pumilus* ONU 554. Раніше вона вже була виявлена у морського штаму *Bacillus pumilus* SP21 [19]. Їй властива відносно слабка (МІК 100м/мл) антимікробна активність по відношенню до *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Ліпоаміди є дуже простими сполуками і фактично являють собою кон'югат аспарагіну з антеізо жирними кислотами з довжинами ланцюга в діапазоні 11-13. Вони мають низьку антимікробну активність (МІК вище 100 мкг/г) [19]. Важливо не плутати дані сполуки з амідами ліпоєвої кислоти. Можливості сучасних методів геноміки на цей час не дозволяють локалізувати в геномі детермінанти біосинтезу ліпоаміда А.

Черговою цікавою та специфічною у бактерій виду *Bacillus pumilus* є сполука AI-77, активна проти грам-позитивних та грам-негативних бактерій, цитотоксична, має антихолестеричні та протизапальні властивості. Сполука AI 77A належить до амікумацинів – антибіотиків, які дуже характерні саме для бацил. Відомо лише три подібні сполуки для актинобактерій і майже трьох десятків бацил, що не характерно для жодного іншого класу антибіотиків [128].

Речовини даної групи складаються з консервативного дигідроізокумаринового ядра та сполученої з ним амідним зв’язком типоспецифічної частини. Сполука AI 77 має антибактеріальну активність по відношенню до збудника виразки шлунку *Helicobacter pylori.* Механізм його дії полягає у зв’язуванні молекули одночасно з мРНК та 16S рРНК малої субодиниці рибосоми, що спричиняє припинення синтезу білка. Біосинтетичні кластери для амікумацин-подібних антибіотиків вивчено дуже слабко. Шляхом порівняння за допомогою програмного забезпечення Easyfig було показано певну гомологію кластера гібридної (НРПС/ПКС) синтетази з геному *Bacillus pumilus* ONU 554 та кластером добре вивченого антибіотика даної групи – ксенокумацину (рис. 4.23) [95].

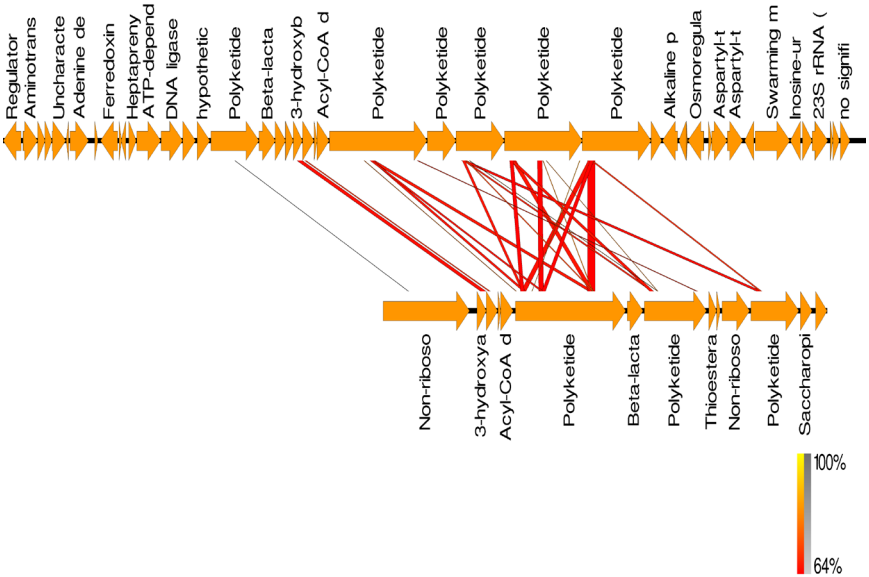

Рис. 4.23. Порівняння кластера AI-77 з геному *Bacillus pumilus* ONU 554 (вгорі) та ксенокумацину з геному *Xenomonas* sp. (внизу) [67]. Червоним позначено ділянки з гомологією >90%

Аналіз інших метаболітів, що залишилися не ідентифікованими (для *Bacillus velezensis* ONU 553 - 58, для *Bacillus pumilus* ONU 554 – 22, *Bacillus subtilis* ONU 559 – 28), являє собою складну задачу. Як було встановлено за допомогою аналізатора transATor, структура продуктів трансАТ-полікетидсинтетаз, що були виявлені в досліджених геномах та ідентифіковані antiSMASH як макролактин, дифіцидин та бацилін, не відповідає відомій структурі для даних сполук [66]. Тому реальні продукти цих генетичних комплексів потребують подальшої ідентифікації [95].

Обговорення

Мікробіота морських водойм є перспективним джерелом продуцентів нових антимікробних метаболітів. Дане судження базується на двох засадах. По-перше, дані біотопи характеризуються специфічними гідрологічними та фізико-хімічними умовами, що сприяє формуванню власного генного пулу у прокаріотної мікробіоти; по-друге, морські водойми через обмежену гідроциркуляцію і несприятливі для тварин-пертурбаторів ґрунту умови мають відносно механічно стабільні пласти осадів [9]. Остання обставина робить можливим перетворення донних відкладень таких водойм на своєрідні «банки діаспор», де можуть зберігатися кріптобіотичні форми мікроорганізмів з суходолу, шельфу та пелагіалі. Найбільш цікавими для класичного мікробіологічного дослідження є ендоспори бактерій, через їх високу здатність до переживання несприятливих умов та високий біосинтетичний потенціал. Через відносну технічну простоту виділення об'єктом даного дослідження було обрано аеробних бацил. Додатковим аргументом на користь виділення саме бацил є їх відносна однорідність за характеристиками резистентності ендоспор [39, 85, 93].

Для ізоляції аеробних споротвірних бактерій було використано проби глибоководних донних відкладень Чорного моря, відібраних з глибини до 2080 метрів в ході експедицій M84/2 Бременського університету на науково-дослідному судні METEOR: станції 233, 242, 258, 269 [22], які були передані Б.Г. Александровим з Інституту морської біології НАНУ на кафедру мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ для мікробіологічних досліджень; та зібрані науковим співробітником БННЦ ОНУ Г.В. Лісютіним на науково-дослідному судні «MARE NIGRUM» (Румунія) - станція 116. Дані глибини характеризуються високим гідростатичним тиском, відносно низькими температурами (8-9 °C) та анаеробіозом на фоні з насиченістю води сірководнем (при концентрацій 0,5-1,5 мкмоль/л [22]. Аборигенна мікробіота донних відкладень досі лишається маловивченою та, гіпотетично, складається з двох великих кластерів – синтрофних асоціацій анаеробних метанокиснюючих архей з сульфатредукувальними бактеріями (карбонат, що утворюється в результаті цього надзвичайно малоенергоефективного процесу, утворює рифоподібні

структури в місцях виділення метану з донних відкладень) [24, 71], та спільноти мікроорганізмів, що відповідають за деградацію органічних часток, седиментованих з оксигенованих шарів води [122]. Концентрація клітин анаеробів зі зрозумілих причин як мінімум на два порядки перевищує значення для аеробів та сягає значень 10^8, а для анаеробних метанокиснюючих мікроорганізмів навіть більших значень [71, 105].

Всупереч відомим фактам присутності на цих глибинах лише облігатних анаеробів нами було зроблено припущення про можливу наявність в осадах ендоспор бактерій, які осідали на дно з морської товщі в агрегатах разом з "морським снігом", формуючи морські відкладення. Шляхом радіоізотопного аналізу було показано, що швидкість накопичення донних осадів у Чорному морі оцінюється в діапазоні від 0,1 мм у глибинних ділянках до 0,5 мм за рік близ берегів [38, 118]. Уже в перших посівах нами було виявлено присутність в морських глибоководних осадах значної кількості споротвірних бактерій, які добре росли в аеробних умовах.

Тому перший етап роботи було присвячено визначенню чисельності мезофільних аеробних споротвірних бактерій в донних відкладеннях Чорного моря. Для різних регіонів земної кули відомі різні дані по чисельності таких мікроорганізмів в донних відкладеннях. Звичайний консенсус полягає в тому, що донні відкладення (відносно) ізольованих водойм містять більше ендоспор аеробів, ніж відкритих водойм, що пояснюють більшою значущістю річкового привнесення [101]. Проблемою для інтерпретації в такому ключі отриманих даних є специфіка донних відкладень Чорного моря. Через свою анаеробність та низьку температуру вони, з високою вірогідністю, позбавлені активної аеробної мезофільної мікробіоти, тому характеристики фонду ендоспор повинні бути близькими до таких, що очікуються від аналогічних резервуарних біотопів – зокрема, підводним солоним озерам, добре вивченим в роботі Sass et al. (2008).

Встановлено, що в осадах Чорного моря загальна чисельність гетеротрофних бактерій приймала значення в діапазоні 10^4-10^7 КУО/г, а споротвірних бактерій, що виросли з ендоспор, - 10^2-10^6 КУО/г, тобто приблизно на порядок менше. Ці дані по-

гано узгоджуються з відомим результатом про значну долю споротвірних форм серед мікробіоти напівзамкнених та замкнених водойм. Так, в роботі, де вперше було отримано такий результат, частка спороутворювачів сягала 70%. Проте простежується відповідність з вищезгаданим результатом Sass et al (2008), де при загальній чисельності помірно-галофільних бацил порядку 10^5 КУО/г тотальна чисельність локальної мікробіоти мала порядок 10^7 КУО/г. Динаміка загальної чисельності гетеротрофних та споротвірних бактерій в залежності від горизонту відрізняється. Так, для перших виявлено тренд до збільшення КУО/г з глибиною горизонту. Вміст ендоспор повільно знижується зі збільшенням глибини з 5×10^5 КУО/г до приблизно 1×10^5 КУО/г.

У процесі визначення чисельності виділено та очищено 130 ізолятів аеробних споротвірних бактерій з донних відкладень Чорного моря. Для масової оцінки біорізноманітності аеробних бацил донних відкладень було використано аналіз спектрів жирних кислот. Даний метод добре відпрацьований на представниках даної групи; головною практичною проблемою інтерпретації його результатів є значна недооцінка реального біорізноманіття аеробних споротвірних бактерій у навколишньому середовищі, що призводить до браку в базах даних ЖК-спектрів для численних, але невідомих видів. Це призвело до того, що близько 11% отриманих штамів не було ідентифіковано. Результати ідентифікації виявилися дещо неочікуваними. Так, виявлено, що близько 50% отриманих ізолятів належить до трьох видів, що вже відомі як мешканці ґрунту – *Bacillus megaterium*, *Brevibacillus reuszeri* та *Bacillus subtilis*. Лише один з цих видів відомий раніше як домінантний вид аеробних бацил у морських відкладеннях, а інші два (*B. cereus* та *B. pumilus*) також були виявлені, але в даному випадку вони складають лише 4,6% від загального розміру колекції та представлені, відповідно, 1 та 5 штамами [13].

Виділені ізоляти ідентифіковано методом хемотаксономії шляхом порівняння спектрів жирних кислот та віднесено до видів *Bacillus megaterium, Brevibacillus reuszeri, Bacillus subtilis, Bacillus viscosus, Bacillus licheniformis, Bacillus luciferensis, Bacillus pumilus, Bacillus cereus, Bacillus atrophaeus, Bacillus halmapalus*, *Bacillus* sp. GC group 22, *Paenibacillus larvae, Brevibacillus*

choshinensis. Ідентифікація штамів, визначених автоматично як *Bacillus* sp. GC group 22, є відкритим питанням, оскільки Вільсон з співавторами пропонують визначати їх як *Bacillus firmus* [135].

В цілому, біорізноманітність донних відкладень виявилася близькою до такого в ґрунтах. Також виявлено представників кількох рідкісних видів, зокрема три представники *B. luciferensis*, типовий штам якого було ізольовано з ґрунту на Південних Сендвічевих островах (Субантарктика) [80]. При порівнянні між собою розподілів по видам з окремих станцій виявився факт великої схожості їх між собою (табл. 4.6). В усіх випадках *Bacillus megaterium* GC subgroup A входить до трійки самих численних штамів. Це враження знаходить підтвердження при порівнянні між собою індексів різноманіття Сімпсона, які розраховані за допомогою вищезгаданого інструменту, для станцій 233, 242, 258 та 269. Вони дорівнюють, відповідно, 0,1; 0,1; 0,08 та 0,2, тобто практично рівні.

У подальшому отримані ізоляти були охарактеризовані за антагоністичною активністю по відношенню до збудників опортуністичних інфекцій людини і тварин *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* B-4001, *Bacillus subtilis* ATCC 10774, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* B-329, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Лише 32% протестованих штамів продемонстрували здатність до пригнічення росту збудників опортуністичних інфекцій людини та тварин. Найбільш активними виявилися штами, що було віднесено до видів відомих своєю здатністю до синтезу численних антимікробних метаболітів. Так, значна активність відмічалася для *B. subtilis* з показником 60% та *B. licheniformis* - 58%, *B. amyloliquefaciens* - 57%, відповідно. Цікаво, що дуже близьке значення продемонстрували штами виду *B. agaradhaerens* (66%), для якого не зареєстровано здатності до синтезу антибіотиків чи бактеріоцинів. З нечисленних видів високу активність виявили *P. larvae, P. macerans* та *B. atrophaeus* з відповідним показником 86%. Найбільш низька активність відмічалася для штамів видів *B. megaterium* (26%), *B. pumilus* (19%), *B. cereus* (17%) та *Br. reuszeri* (6%) [61]. За даними літератури мало інформації про

антимікробну активність та її фактори для даних видів, окрім *B. pumilus* відомого своїми антибіотиками групи амікумацинів проти *H. pylori* [112]. Для *B. cereus* відомі маловивчені та некласифіковані низькомолекулярні бактеріоцини, а для *B. megaterium* сполуки групи бактеріолізинів [145].

Найбільш активними досліджувані штами були по відношенню до *Candida albicans* ATCC 10231, *Proteus vulgaris* ATCC 6896 та *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Найменш чутливими виявилися тест-штами *Pseudomonas aeruginosa* B-329, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. Сам факт чутливості тест-штамів, що належать до групи ESKAPE, до продуктів метаболізму ізолятів є багатообіцяючим, її низька ступінь вираженості може свідчити лише про низькі темпи синтезу активного фактору. Показано високий ступінь антагонізму досліджуваних штамів до грам-позитивних бактерій *S. aureus* та *B. cereus* (частка активних бактерій по відношенню до них сягає 89% та 85%, відповідно, серед усіх активних штамів). На цьому фоні показовою деталлю є суттєва різниця між середньою антагоністичною активністю досліджених штамів по відношенню до індикаторних штамів *B. cereus* та *B. subtilis*. Дані риси антагоністичної активності можуть вказувати на роль в її формуванні саме бактеріоцинів, а не антибіотиків, на що вказує висока селективність до споріднених до продуцента штамів, характерна для бактеріоцинів [113].

За показниками антимікробної активності було відібрано штами *B. velezensis* ONU 553 (висока активність по відношенню до ентеробактерій), *B. megaterium* ONU 554 (активний по відношенню до грам-позитивних бактерій, включаючи *S. aureus*) та *B. subtilis* ONU 559 (активний по відношенню до *C. albicans*), для подальших досліджень їх біологічних властивостей та аналізу спектрів екзометаболітів та геномів шляхом їх секвенування. Результати вивчення показників вуглеводного складу, спектрів утилізації цукрів, чутливості до антибіотиків та морфології відібраних бактерій *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 є цілком типовими для цих видів.

У спектрах жирних кислот виявлено специфічні жирні кислоти – для *B. velezensis* ONU 553 це 17:0, , 13:0 anteiso, 14:0

anteiso, 11:0 2OH, для *B. pumilus* ONU 554 такою жирною кислотою є 15:0 iso 3OH, для *B. subtilis* ONU 559 - 18:0, 17:0 iso 3OH, 17:0 2OH, 19:0 iso, 19:0 anteiso, відповідно [11]. Показники індексів термофільності HAI та a15/i15 штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 характерні для мезофільних бактерій [73]. Температурні діапазони росту для даних штамів не визначалися, проте всі вони демонстрували задовільний ріст за інкубації при 30 °C.

Дані тотального вмісту протеіногенних амінокислот дали свою цікаву інформацію. Для їх аналізу було використано методику Moura по порівнянню послідовностей амінокислот за спаданням вмісту. Технічно метод було реалізовано шляхом порівняння даних послідовностей за допомогою рангової статистики Кендела, реалізованої на мові Пайтон. Виявилося, що послідовності для штамів *B. pumilus* ONU 554 та *B. velezensis* ONU 553 статистично достовірно близькі до штамів піщаного узбережжя. Відповідно, це в сукупності з вищезазначеними результатами аналізу жирнокислотного складу даних штамів може свідчити про алохтонність досліджуваних штамів для донного ґрунту анаеробної зони Чорного моря [11]. На жаль, використання цього методу є досить рідкісним прийомом і неможливо представити літературні приклади його використання для бацил.

Дані про вуглеводний склад є не такими однозначними і вцілому характеризують дані мікроорганізми як представників роду *Bacillus*. Зокрема, у них виявлено цукор хіновозу, що характерний для ендоспор *B. subtilis* та вегетативних форм деяких штамів цього виду [138]. Цікавою знахідкою є виявлення арабінози, що серед прокаріот відома лише для ряду актинобактерій як компонент арабіногалактану [11, 42, 51].

Методи видової ідентифікації мікроорганізмів, зокрема прокаріот останніми роками зсуваються від використання окремих високонсервативних послідовностей на зразок 16S рДНК чи конкатенатів таких генів, до порівняння між собою повних геномів. Ця задача являє собою складну проблему для обчислювальної біології, зокрема через брак ефективних алгоритмів та обчислювальних потужностей. Різноманітні індекси міжгеномної подібності ще далекі від досконалості, тому оптимальним є їх

комбіноване використання. Для нашої роботи було використано три таких індекси: OrthoANI (реалізований через спеціальне програмне забезпечення), dDDH (за формулою d_4) та вмісту GC-пар (останні методи реалізовано на базі пайплайну TYGS). Інтерпретація останнього в якості індексу повногеномної подібності може виглядати дивною, але даний індекс відповідає основним критеріям, хоча зі зрозумілих причин погано відображає первинну структуру ДНК. З використанням цих методів найбільш антагоністично активні штами було визначено як *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559.

Загальна характеристика секвенованих геномів цих бактерій добре укладається в діапазон значень окремих ознак, властивих відповідним видам [6, 54, 74, 99, 114]. Розміри геномів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 мають, відповідно, 3934563, 3642544, 4004302 п.о., вміст ГЦ-пар - 46,69; 41,93; 43,90%%, відповідно, кількість відкритих рамок зчитування знаходиться в діапазоні 3749-4084. У геномах *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 виявлено, відповідно, чотири, три та два профагові елементи (в *B. pumilus* ONU 554 один з них локалізований на плазміді). Бактерії штаму *B. pumilus* ONU 554 мають одну плазміду, що також є досить характерним для штамів цього виду [6, 48]. Геном штаму *B. subtilis* ONU 559 приблизно на 200 кб менший за геном типового, дві з делецій відповідають профагам типового штаму. Також наявні 10 біосинтетичних кластерів, з яких 3 неідентифіковані та гіпотетичні детермінанти резистентності до макролідних та аміноглікозидних антибіотиків, але тест Байера-Кірбі її наявності не підтвердив.

Геном штаму *B. pumilus* ONU 554 майже на 100 кб менший за геном відповідного типового штаму в той час як геном *B. velezensis* ONU 553 більший за геном типового штаму на 16 кб. Вміст біосинтетичних кластерів для цих геномів дорівнює 13 та 14, відповідно, з яких неідентифікованими є 3 та 4. В геномі штаму *B. pumilus* ONU 554 виявлено детермінанту резистентності до хлорамфеніколу, реалізація якої була спростована експериментально. Натомість, штам *B. velezensis* ONU 553, в геномі якого не було виявлено жодних детермінант антибіотикорезистентно-

сті, виявися відносно стійким до тетрацикліну. Обидва штами поєднує наявність генетичного кластеру, що кодує різні варіанти замкненого «голова до хвоста» бактеріоцину (амілоцикліцину для *B. velezensis* ONU 553 та пумілярину *B. pumilus* ONU 554) [114, 130].

Для видів *B. subtilis*, *B. pumilus* та *B. velezensis* відомий широкий спектр вторинних метаболітів, до якого входять антибактеріальні, антифунгальні сполуки, а також сидерофори. З біохімічної точки зору ці сполуки класифікуються як різноманітні ліпопептиди, полікетиди, гібридні та некласифіковані сполуки. Методом рідинної хромато-мас-спектрометрії у бактерій штаму *Bacillus velezensis* ONU 553 нами виявлено та ідентифіковано 90, *Bacillus pumilus* ONU 554 – 33, *Bacillus subtilis* ONU 559 - 43 метаболіти. Серед ліпопептидів вивчених штамів виявлено сполуки малої частини класів, які відомі для бацил. Ці сполуки представлено двома класами – сурфактини (зокрема антеізо-С16-сурфактин, сурфактин В2 1-Ме естер) та фенгіцини, щоправда, кожен з них представлений великою різноманітністю представників (що скоріше пояснюється біохімічними причинами, ніж генетичними) [30, 66, 94]. Всі три штами синтезують сполуки класу сурфактинів, причому спектри демонструють видоспецифічність. Зокрема виявлені варіанти сурфактинів вже відомі саме для цих видів. Цікавою знахідкою є виявлення рідкісного варіанту сурфактинів – гагеотетринів, які фактично є незамкненими в кільце аналогами сурфактинів, для *B. velezensis*; раніше вони були відомі лише для одного з штамів *B. subtilis*, до речі, морського походження [125]. Цікаво, що макролактинові кислоти – метаболіти, що також є результатом синтезу з пропущенням етапу циклізації – також відомі для морських бактерій [117]. Також виявлено антибіотик з групи амікумацинів AI-77 у штаму *B. pumilus* ONU 554. Цікавою знахідкою є виявлення пентапептиду з протеазоінгібуючою активністю GPFPI та ідентифікація його біосинтетичного кластеру. Цей пептид вже відомий для представників виду [91]. Багато сполук лишилися не ідентифікованими, їх ідентифікація потребує окремого дослідження [95].

В підсумку можна стверджувати, що донні відкладення Чорного моря підтверджують свою характеристику як «насіннє-

вого банку» для бактерій, що населяли старі в геологічному плані біотопи поверхні та прибережних районів, і місця перебування яких вже, ймовірно, знищені змінами рельєфу, клімату чи людською діяльністю. Вивчення генофонду законсервованих в товщі відкладень ендоспор може додати до скринінгових досліджень нового виміру – часового, даючи можливість вивчати і використовувати не лише зразки сучасного генетичного матеріалу, але й такого з минулих епох. Аеробні споротвірні бактерії показали свою біологічну активність. Подальше вивчення їх біорізноманітності, генетичного та біосинтетичного потенціалу потенційно несе велику користь для біотехнології та фундаментальної мікробіології і навіть інших природничих наук, зокрема геології, оскільки може пролити світло на закономірності зміни біотопів на берегах Чорного моря та морських басейнів, що передували йому в часі. Виявлені та вивчені антагоністично активні штами показали свою перспективність як продуцентів вже відомих та нових сполук, а також потенціал як матеріалу для розробки пробіотичних препаратів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Васильєва Н. Ю., Крилова К. Д., Кристофферсен Й. Б., Дубровіна О. А., Іваниця В. О. Мікробна різноманітність прибережних вод Одеської затоки Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2018. – № 4. – Р. 63–75.
2. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.
3. Дзюблюк Н. А., Варбанець Л. Д., Булигіна Т. В. Вплив ліпополісахаридів *Pantoea agglomerans* на активність протеаз Bacillus // Мікробіологічний журнал. – 2018. – Т. 80, № 1. – Р. 27–35.
4. Дзюблюк Н. А., Чернишенко В. О., Броварська О. С., Варбанець Л. Д. Порівняльна характеристика протеаз *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324 і *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465 // Мікробіологічний журнал. – 2018. – Т. 80, № 5. – Р. 36–47.
5. Іваниця В. О., Боброва О. Є., Остапчук А. М., Крістофферсен Й. Б., Коротаєва Н. В., Лісютін Г. В. та ін. Біологічна різ-

номанітність бактерій ґрунту та поверхневих вод Чорного моря // Наук. Зап. Терноп. Нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. – 2015. – Р. 270–273.
6. Іваниця В. О., Штеніков М. Д., Остапчук А. М., Васильєва Н. Ю., Калиновський Й. Сіквенс геному *Bacillus pumilus* ONU 554, ізольованого з глибоководних донних відкладень Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – Т. 50, № 3. – С. 46–57.
7. Иваница В. А., Бухтияров А. Е. Таксономический состав гетеротрофных бактерий Одесского прибережья, устойчивых к тяжелым металлам // Морський екологічний журнал. – 2004. – Т. 3, № 3. – Р. 49–54.
8. Іваниця В. О., Штеніков М. Д., Остапчук А. М. Факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії глибоководних відкладень Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – Т. 40, № 4. – С. 94–103.
9. Лебедь А. А. Микробиологическая характеристика донных осадков западного шельфа Черного моря // Экология моря. – 1987. – № 26. – Р. 48–50.
10. Штеніков М. Д., Іваниця В. О. Бактеріоцини факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – Т. 33, № 2. – Р. 6–32.
11. Штеніков М. Д., Остапчук А. М., Іваниця В. О. Склад жирних кислот, амінокислот та моносахаридів бактерій роду Bacillus, виділених з донних відкладень Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – Т. 48, № 1. – Р. 20–31.
12. Abdi H. Kendall rank correlation / Ed. Salkind N. J. // Encyclopedia of Measurement and Statistics.– Thousand Oaks (CA): Sage, 2007. – P. 508–510.
13. Ammini P., Kiran K., Jiya J., Neetha J., Santha N. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India // Braz J Microbiol. – 2009. – V. 40, № 2. – P. 269–275.
14. Armenteros A. J. J., Tsirigos K. D., Sønderby C. K., Petersen T. N., Winther O., Brunak S. et al. Signal P 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks // Nat Biotechnol. – 2019. – V. 37, № 4. – P. 420–423.

15. Arndt D., Grant J. R., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool // Nucleic Acids Res. –2016. – V. 44, № 1. – P. 16–21.
16. Aunpad R., Panbangred W. Evidence for two putative holin-like peptides encoding genes of *Bacillus pumilus* strain WAPB4 // Current microbiology. – 2012. – V. 64, № 4. – P. 343–348.
17. Auch A. F., von Jan M., Klenk H. P., Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison // Standards in genomic sciences. – 2010. – V. 2, № 1. – P. 117–134.
18. Balunas M. Natural products as aromatase inhibitors: Identification and structure-activity aspects. – University of Illinois at Chicago: ProQuest Dissertations Publishing, 2007. – 24 p.
19. Berrue F., Ibrahim A., Boland P., Kerr R. G. Newly isolated marine *Bacillus pumilus* (SP21): A source of novel lipoamides and other antimicrobial agents // Pure Appl. Chem. – 2009. – V. 81, № 6. – P. 1027–1031.
20. Bertelli C., Laird M. R., Williams K. R., Lau B. Y., Hoad G., Winsor G. L., Brinkman F. S. L. IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets // Nucleic Acids Research. – 2017. – V. 45. – P. 30–35. doi: 10.1093/nar/gkx343
21. Blin K., Shaw S., Steinke K., Villebro R., Ziemert N., Lee S. Y. et al. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline // Nucleic Acids Res. – 2019. – V. 47, № 1. – P. 81–87.
22. Bohrmann G., Ohling G. R/V Meteor Cruise Report M84/2 / Eds. G. Bohrmann, G. Ohling – Bremen, 2011. – 184 p.
23. 23. Borriss R., Danchin A., Harwood C. R., Médigue C., Rocha E. P. C, Sekowska A., Vallenet D. *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement // Microbial biotechnology. – 2018. – V. 11, № 1. – P. 3–17.
24. Briggs B. R., Pohlman J. W., Torres M., Riedel M., Brodie E. L., Colwell F. S. Macroscopic Biofilms in Fracture-Dominated Sediment That Anaerobically Oxidize Methane // Applied And Environmental Microbiology. – 2011. – V. 77, № 19. – P. 6780–6787.

25. Brito P. H., Chevreux B., Serra C. R., Schyns G., Henriques A. O., Pereira-Leal J. B. Genetic competence drives genome diversity in *Bacillus subtilis* // Genome biology and evolution. – 2018. – V. 10, № 1. – P. 108–124.
26. Bull A. T., Stach J. E. M. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery // Trends in microbiology. – 2007. – V. 15, № 11. – P. 491–499.
27. Burton A., Kearns D. The large pBS32/pLS32 plasmid of ancestral *Bacillus subtilis* // Journal of Bacteriology. – 2020 – V. 202, № 18. – P. 1–11. doi: 10.1128/JB.00290-20
28. Chopra L., Singh G., Choudhary V., Sahoo D. K. Sonorensin: an Antimicrobial Peptide, Belonging to the Heterocycloanthracin Subfamily of Bacteriocins, from a New Marine Isolate, *Bacillus sonorensis* MT93 // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – V. 80, № 10. – P. 2981–2990.
29. Chun B. H., Kim K. H., Jeong S. E., Jeon C. O. Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group – *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis* – revealed by pan-genome analysis // Food Microbiol. – 2019. – V. 77. – P. 146–157.
30. Cochrane S. A., Vederas J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates // Med Res Rev. – 2016. – V. 36, № 1. – P. 4–31.
31. Collins F. W., O'Connor P. M., O'Sullivan O., Rea M. C., Hill C., Ross R. P. Formicin – a novel broad-spectrum two-component lantibiotic produced by *Bacillus paralicheniformis* APC 1576 // Microbiology. – 2016. – V. 162, № 9. – P. 1662–1671.
32. Corinaldesi C. New perspectives in benthic deep-sea microbial ecology // Frontiers in Marine Science. – 2015. – V. 2. – P. 1–12. https://doi.org/10.3389/fmars.2015.00017
33. Costa da M. S., Albuquerque L., Nobre F. M., Wait R. The Identification of Fatty Acids in Bacteria // Methods in Microbiology. – 2011. – V. 38, № 1. – P. 183–196.
34. Darling A. E., Mau B., Perna N. T. Progressive Mauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement // PloS one. – 2010. – V. 5, № 6. – P. 1. –17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147

35. De Menezes C. B. A., Afonso R. S., de Souza W. R., Parma M. M., de Melo I. S., Fugita F. L. S. *Williamsia aurantiacus* sp. nov. a novel actinobacterium producer of antimicrobial compounds isolated from the marine sponge // Archives of microbiology. – 2019. – V. 201, № 5. – C. 691–698.
36. De S., Kaur G., Roy A., Dogra G., Kaushik R., Yadav P., Singh R., Datta T. K., Goswami S. L. A Simple Method for the Efficient Isolation of Genomic DNA from Lactobacilli Isolated from Traditional Indian Fermented Milk (dahi) // Indian J Microbiol. – 2010. – V. 50, № 4. – P. 412–418. doi: 10.1007/s12088-011-0079-4
37. De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Second Edition. – Springer; Heidelberg; London; New York, 2009. – V. 3. The Firmicutes. – 1450 p.
38. Degens E. T., Stoffers P., Golubic S., Dickman M. D. Varve Chronology: Estimated Rates Of Sedimentation In The Black Sea Deep Basin. – 1978. – P. 499–508. doi: 10.2973/DSDP.PROC.42-2.114.1978
39. Dhakal D., Pokhrel A. R., Shrestha B., Sohng J. K. Marine Rare Actinobacteria: Isolation, Characterization, and Strategies for Harnessing Bioactive Compounds // Frontiers in Microbiology. – 2017. – V. 8, № 1106. – P. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2017.01106
40. Diomandé S. E., Chamot S., Antolinos V., Vasai F., Guinebretière M. H., Bornard I. et al. The CasKR Two-Component System Is Required for the Growth of Mesophilic and Psychrotolerant *Bacillus cereus* // Applied And Environmental Microbiology. – 2014. – V. 80, № 8. – P. 2493–2503.
41. Diomandé S. E, Nguyen-The C., Guinebretière M. H., Broussolle V., Brillard J. Role of fatty acids in Bacillus environmental adaptation // Frontiers in Microbiology. – 2015. – V. 6. – P. 1–20.
42. Doyle R. J. Glycomicrobiology / Ed. R. J. Doyle.– Kluwer Academic Publishers; New York; Boston; Dordrecht; London; Moscow, 2002. – 557 p.

43. Du H., Jiao N., Hu Y., Zeng Y. Diversityand distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments // FEMS Microbiology Ecology. – 2006. – V. 57. – P. 92–105.
44. Dunlap C. A., Kim S.-J., Kwon S.-W., Rooney A. P. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2016. – V. 66, № 3. – P. 1212–1217. doi: 10.1099/ijsem.0.000858
45. Ettoumi B., Bouhajja E., Borin S., Daffonchio D., Boudabous A., Cherif A. Gammaproteobacteria occurrence and microdiversity in Tyrrhenian Sea sediments as revealed by cultivation-dependent and -independent approaches // Systematic and Applied Microbiology. – 2010. – V. 33, № 4. – P. 222–231.
46. Ettoumi B., Guesmi A., Brusetti L., Borin S., Najjari A., Boudabous A., Cherif A. Microdiversity of Deep-Sea Bacillales Isolated from Tyrrhenian Sea Sediments as Revealed by ARISA, 16S rRNA Gene Sequencing and BOX-PCR Fingerprinting // Microbes and Environments. – 2013. – V. 28, № 3. – P. 361–369.
47. Ettoumi B., Raddadi N., Borin S., Daffonchio D., Boudabous A., Cherif A. Diversity and phylogeny of culturable spore-forming Bacilli isolated from marine sediments // Journal of Basic Microbiology. – 2009. – V. 49. – P. 13–23.
48. Evdokimova O. V., Chindareva M. A., Valentovich L. N. Characteristic of plasmids of *Bacillus pumilus* isolated in Belarus // Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series. – 2019. – V. 64, № 3. – P. 292–301.
49. Fan B., Blom J., Klenk H.-P., Borriss R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis* and *Bacillus siamensis* Form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* Species Complex // Frontiers in Microbiology. – 2017. – V. 8. – P. 1–15.
50. Fan B., Wang C., Song X., Ding X., Wu L., Wu H. et al. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for

Plant Growth Promotion and Biocontrol // Frontiers in Microbiology. – 2018. – V. 162, № 9. – P. 1–7.
51. Fox A., Stewart G. C., Waller L. N., Fox K. F., Harley W. M., Price R. L. Carbohydrates and glycoproteins of *Bacillus anthracis* and related bacilli: targets for biodetection // Journal of Microbiological Methods. – 2003. – V. 54, № 2. – P. 143–152.
52. Gärtner A. Isolation and characterization of bacteria from the deep sea and their potential to produce bioactive natural products: dis. … des Doktor grades der Mathematisch-Naturwissen schaftlichen. – Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2011. – 151 p.
53. Gholizadeh S. S., Baserisalehi M., Bahador N. Study on Bioactive Compounds Produced by Soil Origin *Brevibacillus* spp. // Nature Environment and Pollution Technology. – 2013. – V. 12, № 2. – P. 209–214.
54. Grady E. N., MacDonald J., Ho M. T., Weselowski B., McDowell T., Solomon O. et al. Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6 // BMC microbiology. – 2019. – V. 19, № 1. – P. 1–14.
55. Guerrant G. O., Moss C. W. Determination of monosaccharides as aldononitrile, O-methyloxime, alditol, and cyclitol acetate derivatives by gas-chromatography // Analytical Chemistry. – 1984. – V. 56, № 4. – P. 633–638.
56. Halim M. A., Rahman A. Y., Sim K. S., Yam H. C., Rahim A. A., Ghazali A. H., Najimudin N. Genome sequence of a Gram-positive diazotroph, *Paenibacillus durus* type strain ATCC 35681 // Genome announcements. – 2016. – V. 4, № 1. – P. 1–2. doi: 10.1128/genomeA.00005-16
57. Heyrman J., Vos P. D. Marinibacillus // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. – 2015. – P. 1–5. doi: 10.1002/9781118960608.gbm00560
58. Heyrman J., Vos P. D. Oceanobacillus // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. – 2015. – P. 1–9. doi: 10.1002/9781118960608.gbm00539
59. Helfrich E. J. N., Ueoka R., Dolev A., Rust M., Meoded R. A., Bhushan A. et al. Automated structure prediction of trans-ac-

yltransferase polyketide synthase products // Nature Chemical Biology. – 2019. – V. 15, № 8. – P. 813–821.
60. Honma M., Tanaka K., Konno K., Tsuge K., Okuno T., Hashimoto M. Termination of the structural confusion between plipastatin A1 and fengycin IX // Bioorg Med Chem. – 2012. – V. 20, № 12. – C. 3793–3798.
61. Ivanytsia V. O., Shtenikov M. D., Ostapchuk A. M. Facultatively anaerobic sporeforming bacteria of deep-sea sediments of the Black sea // Microbiology & Biotechnology. – 2017. – V. 40, № 4. – P. 94–103. [in Ukranian]. http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.4(40).119560
62. Jámbor A., Molnár-Perl I. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride // Journal of Chromatography A. – 2009. – V. 1216, № 34 – P. 6218–6223. doi: 10.1016/j.chroma.2009.06.083
63. Joensen K. G., Scheutz F., Lund O., Hasman H., Kaas R. S., Nielsen E. M. et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli* // J. Clin. Micobiol. –2014. – V. 52, № 5. – P. 1501–1510.
64. Kalkatawi M., Alam I., Bajic V. B. BEACON: automated tool for Bacterial Genome Annotation Comparison // BMC Genomics. – 2015. – V. 16, № 1. – P. 1–8.
65. Karikalan S., Mohankumar A. Production, isolation and partially purification of alkaline protease from marine macro algae surface associated *Bacillus* spp. // Int J Biol Res. – 2016. – V. 1, № 1. – P. 63–66.
66. Kaspar F., Neubauer P., Gimpel M. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review // J Nat Prod. – 2019. – V. 82, № 7. – P. 2038–2053.
67. Kautsar S. A., Blin K., Shaw S., Navarro-Muñoz J. C., Terlouw B. R., van der Hooft J. J. J. MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function // Nucleic Acids Res. – 2020. – V. 48, № 1. – P. 454–458.

68. Kawai M., Uchiyama I., Takami H., Inagaki F. Low frequency of endospore-specific genes in subseafloor sedimentary metagenomes // Environmental Microbiology Reports. – 2015. – V. 7, № 2. – P. 341–350.
69. Kemperman R., Kuipers A., Karsens H., Nauta A., Kuipers O., Kok J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574 // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – V. 69, № 3. – P. 1589–1597.
70. Ki J. S., Zhang W., Qian P. Y. Discovery of marine Bacillus species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification // Journal of Microbiological Methods. – 2009. – V. 77, № 1 – C. 48–57.
71. Knittel K., Boetius A. Anaerobic methane oxidizers // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. K. N. Timmis – Springer, 2010. – P. 2023–2032.
72. Kriss A. E. Microbiology and the chief problems in the Black Sea // Deep Sea Research (1953). – 1958. – V. 5, № 2–4. – P. 193–200.
73. Lachnit T., Fischer M., Künzel S., Baines J. F., Harder T. Compounds associated with algal surfaces mediate epiphytic colonization of the marine macroalga *Fucus vesiculosus* // FEMS Microbiology Ecology. – 2013. – V. 84, № 2. – P. 411–420.
74. Lee I., Kim Y. O., Park S. C., Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity // Int J Syst Evol Microbiol. – 2016. – V. 66, № 2. – P. 1100–1103. doi: 10.1099/ijsem.0.000760
75. Li S. W., Liu M. Y., Yang R. Q. Comparative genome characterization of a petroleum-degrading *Bacillus subtilis* strain DM2 // International Journal of Genomics. – 2019. – V. 2019. – P. 1–17. https://doi.org/10.1155/2019/7410823
76. Lima A. O., Cabral A., Andreote F. D., Cavalett A., Pessatti M. L., Dini-Andreote F., da Silva M. A. Draft Genome Sequence of *Bacillus stratosphericus* LAMA 585, Isolated from the Atlantic Deep Sea // Genome Announcements. – 2013. – V. 1, № 3. – P. 1–2.

77. Lin C., Tsai C. H., Chen P. Y., Wu C. Y., Chang Y. L., Yang Y. L. et al. Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01 // PLoS One. – 2018. – V. 13, № 4. – P. 1–17.
78. Liu J.-Y., Pan N.-S., Chen Z.-L. Characterization of an anti-rice bacterial blight polypeptide LCI // Rice Genetics Newsletter. – 1990. – V. 7. – P. 151–154.
79. Liu X., Xu F., Shao C., She Z., Lin Y., Chan W. L. Bioactive metabolites from marine microorganisms // Studies in Natural Products Chemistry. – 2008. – V. 35. – P. 197–310.
80. Logan N. A., De Vos P. Bacillus // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. W. B. Whitman. – John Wiley & Sons, Inc, 2015. – P. 1–164. https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530
81. Logan N. A., De Vos P. Endospore-forming Soil Bacteria. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. – 364 p.
82. Lomstein B. A., Langerhuus A. T., D'Hondt S., Jørgensen B. B., Spivack A. J. Endospore abundance, microbial growth and necromass turnover in deep sub-seafloor sediment // Nature. – 2012. – V. 484, № 7392. – P. 101–104.
83. Ma Z., Hu J. Complete genome sequence of a marine-sediment-derived bacterial strain *Bacillus velezensis* SH-B74, a cyclic lipopeptides producer and a biopesticide // Biotech. – 2019. – V. 162, № 9. – P. 1–7.
84. Mahmoudi N., Robeson M. S., II, H. F. C., Fortney J. L., Techtmann S. M., Joyner D. C et al. Microbial community composition and diversity in Caspian Sea sediments // FEMS Microbiology Ecology. – 2014. – V. 91, № 1. – P. 1–11. https://doi.org/10.1093/femsec/fiu013
85. Mandic-Mulec I., Stefanic P., van Elsas J. D. Ecology of Bacillaceae // Microbiology Spectrum. – 2015. – V. 3, № 1. – P. 1–24.
86. Meier-Kolthoff J. P., Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy // Nat Commun. – 2019. – V. 10, № 1. – P. 1–10.
87. Miranda C. A. C., Martins O. B., Clementino M. M. Species-level identification of Bacillus strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequenc-

ing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis // Antonie van Leeuwenhoek. – 2008. – V. 93. – P. 297–304.
88. Moreno-Letelier A. Divergence and Phylogeny of Firmicutes from the Cuatro Cienegas Basin, Mexico: A Window to an Ancient Ocean // Astrobiology. – 2012. – V. 12, № 7. – P. 674–684.
89. Moura A., Savageau M. A., Alves R. Relative Amino Acid Composition Signatures of Organisms and Environments // PLoS One. – 2013. – V. 8, № 10. – P. 1–9.
90. Murray J. W., İzdar E. The 1988 Black Sea oceanographic expedition: overview and new discoveries // Oceanography. – 1989. – V. 2, № 1. – P. 15–21.
91. Nagamori Y., Kusaka K., Nishimura T., Okada S. Isolation and Characterization of a Bacterial Dipeptidyl Carboxypeptidase Inhibitor from *Bacillus subtilis* 3-16-20 // Journal of Fermentation and Bioengineering. – 1992. – V. 73, № 4. – P. 277–279.
92. Navarro-Muñoz J. C., Selem-Mojica N., Mullowney M. W., Kautsar S. A., Tryon J. H., Parkinson E. I. et al. A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity // Nat Chem Biol. – 2020. – V. 16, № 1. – P. 60–68.
93. Nicholson W. L. Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments // Microbiology And Molecular Biology Reviews – 2000. – V. 64, №3. – P. 548–572.
94. Nishikiori T., Naganawa H., Muraoka Y., Aoyagi T., Umezawa H. Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-fF67. III. Structural elucidation of plipastatins // J Antibiot. – 1986. – V. 39, № 6. – P. 755–761.
95. Ostapchuk A. M., Shtenikov M. D., Ivanytsia V. O. Exometabolites of endospore-forming bacteria of *Bacillus* genus identified by genomic-metabolomic profiling // Ukr Biochem J. – 2020. – V. 92, № 6. – C. 154–164.
96. Overbeek R., Olson R., Pusch G. D., Olsen G. J., Davis J. J., Disz T. et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST) // Nucleic acids research. – 2014. – V. 42, № 1. – P. 206–214.

97. Patel H., Tscheka C., Edwards K., Karlsson G., Heerklotz H. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713 // Biochim Biophys Acta. – 2011. – V. 1808, № 8. – P. 2000–2008.
98. Paulus C., Rebets Y., Tokovenko B., Nadmid S., Terekhova L. P., Myronovskyi M. et al. New natural products identified by combined genomics-metabolomics profiling of marine *Streptomyces* sp. MP131-18 // Sci Rep. – 2017. – V. 7. – P. 1–11.
99. Phelan R. W., Clarke C., Morrissey J. P., Dobson A. D., O'Gara F., Barbosa T. M. Tetracycline resistance-encoding plasmid from *Bacillus* sp. strain 24, isolated from the marine sponge *Haliclona simulans* // Applied and Environmental Microbiology. – 2011. – V. 77, № 1. – P. 327–329. doi: 10.1128/AEM.01239-10
100. Potekhina N. V., Streshinskaya G. M., Tul'skaya E. M., Kozlova Y. I., Senchenkova S. N., Shashkov A. S. Phosphate Containing Cell Wall Polymers of Bacilli // Biochemistry. – 2011. – V. 76, № 7. – P. 745–754.
101. Rafidinarivo H. F., Fujimoto S., Watanabe K., Kitazato K., Kobayashi N. Topographic effects of coastal seas on the composition of the culturable bacterial communities in marine sediments // Hydrobiologia. – 2007. – V. 583. – P. 205–212.
102. Raina V., Nayak T., Ray L., Kumari K., Suar M. A. Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. Chapter 9 // Microbial Diversity in the Genomic Era. – Academic Press, 2019. – P. 137–152.
103. Rainey F., Oren A. Methods in Microbiology. Volume 38 // Taxonomy of Prokaryotes. – Elsevier ltd, 2011. – 474 p.
104. Rosenberg E. The Prokaryotes / Ed. E. Rosenberg // Firmicutes and Tenericutes. – 4 ed. – Springer, 2014. – 573 p.
105. Rylkova O. A., Gulin S. B., Pimenov N. V. Determination of the Total Microbial Abundance in Black Sea Bottom Sediments Using Flow Cytometry // Microbiology. – 2019. – V. 88, № 6. – P. 700–708.
106. Saggese A., Culurciello R., Casillo A., Corsaro M. M., Ricca E., Baccigalupi L. A. Marine Isolate of *Bacillus pumilus* Secretes a Pumilacidin Active against *Staphylococcus aureus* // Mar Drugs. – 2018. – V. 16, № 6. – P. 1–13.

107. Sass A. M., McKew B. A., Sass H., Fichtel J., Timmis K. N., McGenity T. J. Diversity of Bacillus-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments // Saline Systems. – 2008. – V. 4, № 8. – P. 1–11. doi: 10.1186/1746-1448-4-8
108. Sasser M. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids, Technical Note 101. Newark, DE:MIDI. – 1990.
109. Schäffer C., Messner P. The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together // Microbiology. – 2005. – V. 245. – P. 643–651.
110. Schinke C., Martins T., Queiroz S. C. N., Melo I. S., Reyes F. G. R. Antibacterial Compounds from Marine Bacteria, 2010-2015 // J Nat Prod. – 2017. – Vol. 80. – № 4. – P. 1215–1228.
111. Schottroff F., Pyatkovskyy T., Reineke K., Setlow P., Sastry S. K., Jaeger H. Mechanisms of enhanced bacterial endospore inactivation during sterilization by ohmic heating // Bioelectrochemistry. – 2019. – V. 130. – P. 107338. doi: 10.1016/j.bioelechem.2019.107338
112. Shimojima Y., Hayashi H., Ooka T., Shibukawa M., Iitaka Y. Studies on AI-77s, microbial products with gastroprotective activity. Structures and the chemical nature of AI-77s // Tetrahedron. – 1984. – V. 40, № 13. – P. 2519–2527.
113. Shtenikov M. D., Ostapchuk A. M., Ivanytsia V. O. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black Sea sediments // Microbiology & Biotechnology. – 2018. – V. 43, № 3. – P. 82–89.
114. Shtenikov M. D., Ostapchuk A. M., Vasylieva N. Y., Luzhetskyy A. M., Rueckert C., Kalinowski J., Ivanytsia V. O. Characteristics of Genome of *Bacillus velezensis* ONU 553 Strain Isolated from the Bottom Sediments of the Black Sea // Mikrobiol. Z. – 2020. – V. 82, № 3. – P. 14–21.
115. Silva F. J., Ferreira L. C., Campos V. P., Cruz-Magalhães V., Barros A. F., Andrade J. P. et al. Complete Genome Sequence of the Biocontrol Agent *Bacillus velezensis* UFLA258 and Its Comparison with Related Species: Diversity within the Commons // Genome Biol Evol. – 2019. – V. 11, № 10. – P. 2818–2823.

116. Skinnider M. A., Merwin N. J., Johnston C. W., Magarvey N. A. PRISM 3: expanded prediction of natural product chemical structures from microbial genomes // Nucleic Acids Res. – 2017. – V. 45, № 1. – P. 49–54.
117. Smith A. B., Ott G. R. Total syntheses of (−)-macrolactin A,(+)-macrolactin E, and (−)-macrolactinic acid: an exercise in Stille cross-coupling chemistry // Journal of the American Chemical Society. – 1998. – V. 120, № 16. – P. 3935–3948.
118. 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, № 10. – P. 1393–1397.
119. de Sousa A. L., Maués D., Lobato A., Franco E. F., Pinheiro K., Araújo F. et al. PhageWeb–Web interface for rapid identification and characterization of prophages in bacterial genomes // Frontiers in genetics. – 2018. – V. 9. – P. 1–7. https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00644
120. Starikova E. V., Tikhonova P. O., Prianichnikov N. A., Rands C. M., Zdobnov E. M., Ilina E. N., Govorun V. M. Phigaro: high-throughput prophage sequence annotation // Bioinformatics. – 2020. – V. 36, № 12. – P. 3882–3884.
121. Sullivan M. J., Petty N. K., Beatson S. A. Easyfig: a genome comparison visualizer // Bioinformatics. – 2011. – V. 27, № 7. – P. 1009–1010.
122. Suominen S., Dombrowski N., Sinninghe Damsté J. S., Villanueva L. A diverse uncultivated microbial community is responsible for organic matter degradation in the Black Sea sulphidic zone // Environmental Microbiology. – 2021. – V. 23, № 6. – P. 2709–2728. doi:10.1111/1462-2920.1490
123. Süß J., Engelen B., Cypionka H., Sass H. Quantitative analysis of bacterial communities from Mediterranean sapropels based on cultivation-dependent methods // FEMS Microbiology Ecology . – 2004. – V. 51. – P. 109–121.
124. Tao L., Peng W. Bacterial diversity in sediments of core MD05-2902 from the Xisha Trough, the South China Sea // Acta Oceanologica Sinica. – 2014. – V. 33, № 10. – P. 85–93.

125. Tareq F. S., Lee M. A., Lee H. S., Lee Y. J., Lee J. S., Hasan C. M. GageotetrinsA−C, Noncytotoxic Antimicrobial Linear Lipopeptides from a Marine Bacterium *Bacillus subtilis* // Organic Letters. – 2014. – V. 16, № 3. – P. 928–931.
126. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E. P., Zaslavsky L. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44, № 14. – P. 6614–6624.
127. Tiam K. S., Gugger M., Demay J., Le Manach S., Duval C., Bernard C., Marie B. Insights into the Diversity of Secondary Metabolites of Planktothrix Using a Biphasic Approach Combining Global Genomics and Metabolomics // Toxins. – 2019. – V. 11, № 9. – P. 1–18.
128. Tyurin A. P., Efimenko T. A., Prokhorenko I. A., Rogozhin E. A., Malanicheva I. A., Zenkova V. A. Amicoumacins and Related Compounds: Chemistry and Biology // Studies in Natural Products Chemistry. V. 55. – Elsevier, 2018. – P. 385–441.
129. Van Heel A. J., de Jong A., Song C., Viel J. H., Kok J., Kuipers O. P. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins // Nucleic Acids Res. – 2018. – V. 46, № 1. – P. 278–281.
130. Van Heel A. J., Montalban-Lopez M., Oliveau Q., Kuipers O. P. Genome-guided identification of novel head-to-tail cyclized antimicrobial peptides, exemplified by the discovery of pumilarin // Microbial genomics. – 2017. – V. 3, – № 10. – P. 1–9. doi: 10.1099/mgen.0.000134
131. Ventosa A. Marinococcus // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. – 2015. – P. 1–6. https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00538
132. Virtanen P., Gommers R., Oliphant T. E., Haberland M., Reddy T., Cournapeau D. et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python // Nature methods. – 2020. – V. 17. – P. 261–272.
133. Wattam A. R., Brettin T., Davis J. J., Gerdes S., Kenyon R., Machi D. et al. Assembly, Annotation, and Comparative Genomics in PATRIC, the All Bacterial Bioinformatics Resource Center //

Comparative Genomics. Methods Mol Biol. – New York: Humana Press; 2018. – P. 79–101.
134. Wenzel S. C., Meiser P., Binz T. M., Mahmud T., Müller R. Nonribosomal peptide biosynthesis: point mutations and module skipping lead to chemical diversity. –Angew Chem Int Ed Engl. – 2006. – V. 45, № 14. – P. 2296–2301.
135. Wilson C. A., Brigmon R. L., Yeager C., Smith G. W., Polson S. W. Genotypic and Phenotypic Characterization of Aerosolized Bacteria Collected From African Dust Events // Journal of the South Carolina Academy of Science. – 2014. – V. 12, № 1. – P. 8–13.
136. Wörmer L., Hoshino T., Bowles M. W., Viehweger B., Adhikari R. R., Xiao N. et al. Microbial dormancy in the marine subsurface: Global endospore abundance and response to burial // Science Advances. – 2019. – V. 5. – P. 1–8.
137. Wunderlin T., Junier T., Roussel-Delif L., Jeanneret N., Junier P. Endospore-enriched sequencing approach reveals unprecedented diversity of Firmicutes in sediments // Environmental Microbiology Reports. – 2014. – V. 6, № 6. – P. 631–639.
138. Wunschel D., Fox K. F., Black G. E., Fox A. Discrimination among the *Bacillus cereus* group, in comparison to *B. subtilis*, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNA spacer region PCR // Syst. Appl. Microbiol. – 1995. – V. 17, № 4. – P. 625–635.
139. Yoon S. H., Ha S. M., Lim J. M., Kwon S. J., Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity // Antonie van Leeuwenhoek. – 2017. – V. 110, № 10. – P. 1281–1286.
140. Yuan Y., Gao M. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy // Scientific reports. – 2015. – V. 5, № 1. – P. 1–9.
141. Zaitsev Y. P., Alexandrov B. G. Black Sea Biological Diversity. – New York, 1998. – 362 p.
142. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O. et al. Identification of acquired antimicrobial

resistance genes // J Antimicrob Chemother. – 2012. – V. 67, № 11. – P. 2640–2644.
143. Zhang D. J., Liu R. F., Li Y. G., Tao L. M., Tian L. Two new antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus marinus* B-9987 // Chem Pharm Bull. – 2010. – V. 58, № 12. – P. 1630–1634.
144. Zhao P., Xue Y., Gao W., Li J., Zu X., Fu D. et al. Bacillaceae-derived peptide antibiotics since 2000 // Peptides – 2018. – V. 101. – P. 10–16. doi: 10.1016/j.peptides.2017.12.018
145. Zhao X., Kuipers O. P. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species // BMC Genomics. – 2016. – V. 17, № 1. – P. 1–18.