

УДК579.26:551.352:579.22:579.64

М.Д. Штеніков, О.Ю. Зінченко, В.В. Болдирєва
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: shtenikovn@onu.edu.ua

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ МОРСЬКИХ БАКТЕРІЙ РОДІВ *BACILLUS*, *PRIESTIA* І *RAENIBACILLUS* РІЗНИХ ТЕРМОТИПІВ

Мета. Дослідити антагоністичну активність бактерій родів *Bacillus*, *Priestia* і *Raenibacillus* за різних умов культивування. **Методи.** В роботі досліджували 25 штамів антагоністично активних споротвірних бактерій, ізольованих з глибоководних донних відкладень Чорного моря. Визначення термотипів проводилося за результатами аналізу параметрів жирнокислотного профілю. Антагоністична активність по відношенню до тест-штамів умовно-патогенних бактерій виявлялася за методом агарових блоків на середовищах Гаузе № 1 та МПА за різних температур культивування. **Результати.** Аеробні бактерії родів *Bacillus*, *Priestia* та *Raenibacillus* всіх трьох термотипів – термотолерантні, мезофільні та психротрофні, в цілому демонструють нижчу антагоністичну активність за культивування при 37 °С, ніж за культивування при 30 °С на обох середовищах, за винятком помітної більш високої активності психротрофів при 37 °С на середовищі Гаузе № 1. **Висновки.** Встановлено, що приналежність до певного термотипу впливає на характер антагоністичної активності споротвірних бактерій. Антагоністична активність мезофільних та термотолерантних бактерій за більш високої температури культивування нижча, а у психротрофних бактерій за умов культивування при більш високій температурі на середовищі Гаузе № 1 вища.

Ключові слова: *Bacillus*, *Raenibacillus*, антагоністична активність, морські бактерії, термотипи

У часи поступового, але невпинного, розповсюдження антибіотикорезистентних патогенних мікроорганізмів, як ніколи раніше постає проблема вивчення мікроорганізмів – продуцентів антимікробних сполук [14]. У випадку маловивчених та потенційних продуцентів головними питаннями є ті, що стосуються ідентифікації нових сполук. При вивченні вже відомих пар «організм-сполука(-и)» актуальним є питання про можливе розширення спектру метаболітів, які можна отримати від даного організму, та отримання відомих і потрібних промисловості метаболітів у максимальних кількостях. Обидва питання стосуються механізмів регуляції вторинного метаболізму – відносно маловивченого навіть для модельних організмів аспекту їх біології [16].

Однією з методологічних проблем, що постає перед дослідниками при спробах вирішення даної проблеми є те, що саме цікаві для дослідження вторинного метаболізму організми мають дуже складні метаболітні спектри, кож-

© М.Д. Штеніков, О.Ю. Зінченко, В.В. Болдирєва, 2022



на підгрупа метаболітів в яких має власну систему регуляції. В тому числі і через це вичерпне вивчення метаболічної регуляції для кожного окремого виду потребує великих затрат ресурсів. Як яскравий приклад можна привести стан вивчення синтезу відомої «тріади» ліпопептидів бацил – сурфактину, ітурину та фенгіцину [16].

Втім, можна обґрунтовано припустити, що отримання нових метаболітів в промислових кількостях потребує не стільки тонкого молекулярно-біологічного аналізу, скільки урахування особливостей екофізіології окремих груп – оскільки антимікробні сполуки є лише одним з елементів арсеналу інструментів боротьби за існування. Така група організмів, як аеробні спороутвірні бактерії, є цікавим об'єктом для такого роду дослідження через відносну вивченість їх широкого антимікробного спектру, високий потенціал сполук, які відомі для них, та складність клітинної біології, що включає навіть диференціацію клітин у біоплівці [7, 17].

Дослідження антагоністичної активності аеробних споротвірних бактерій залежно від умов культивування проводяться і показують різні, і такі, що важко співставити, результати: так, відомий випадок зниження антифунгальної активності *B. subtilis* за неоптимальної температури культивування в трьох штамів з різними оптимумами росту [5], а в роботі Šimunović [13] найвищу антагоністичну активність проти *Campylobacter jejuni* *B. subtilis* показав за температури 42 °C. На жаль, не вдалося встановити оптимальну температуру для штаму *B. subtilis*, використаного в статті [13], але виходячи з того, що його добову культуру автори вирощували при 37 °C, а за літературними даними [7] оптимальна температура росту штамів даного виду знаходиться в діапазоні 28–30 °C, можна припустити, що для даного штаму температура 42 °C є неоптимальною. Дослідження антагоністичної активності, що були б сфокусовані на особливостях реакції на умови культивування представників різних термотипів, авторам не вдалося знайти.

Метою роботи було дослідити антагоністичну активність бактерій родів *Bacillus*, *Priestia* і *Paenibacillus* за різних умов культивування у зв'язку з їх екофізіологічними властивостями.

Матеріали та методи

В роботі досліджували 25 штамів аеробних споротвірних бактерій родів *Bacillus*, *Priestia* та *Paenibacillus*, отриманих з глибоководних донних відкладень Чорного моря, які зберігаються в Колекції морських і практично корисних мікроорганізмів Одеського національного університету у вигляді клітинних суспензій за -84 °C. Виділення штамів даного музею проводили шляхом культивування розсіяних на агаризоване живильне середовище пастеризованих суспензій донних відкладень при 25 °C [2].

Тест-штами отримані з музею культур мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України; зберігання тест-штамів здійснювали на скошеному середовищі МПА при +4 °C.

Ідентифікацію штамів аеробних споротвірних бактерій проводили за допомогою визначення загального жирнокислотного складу ліпідів методом газової хроматографії з використанням пакету програмного забезпечення для



автоматичної ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI Inc, США).

Інтерпретацію даних, отриманих за допомогою 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 вважалося, що видуవు принадлежність штаму не визначено [11].

Для визначення відношення до температури (термотипу) використовували значення Heat Adaptation Index (HAI) та відношення часток антеізо- та ізо С15 ненасичених жирних кислот (a15/i15). HAI визначали за формулою [4]:

$$\text{HAI} = \frac{(n14:0) + p(n16:0) + p(i14:0) + p(i15:0) + p(i16:0) + p(i17:0)}{p(a15:0) + p(a17:0) + p(n16:1) + p(i17:1(n-10)) + p(16:1\omega7\text{alcohol})}$$

Де р є часткою певної жирної кислоти.

Антагоністичну активність у виділених штамів визначали на щільних середовищах Гаузе № 1 та МПА (Himedia). Як тест-штами було обрано *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та *Escherichia coli* ATCC 25922. Досліджувані штами бацил засівали у двох повторах газомом на поверхню МПА та середовища Гаузе № 1. По одному варіанту кожного штаму на обох середовищах інкубували при 30 °C і 37 °C протягом 48 год. Антагоністичну активність досліджуваних бактерій роду щодо *S. aureus* та *E. coli* перевіряли методом агарових блоків [1]; культури тест-штамів вирощували на МПА при 37 °C протягом 24 годин. За міру рівня використовувалися різниці діаметрів зон затримки росту та відповідних агарових блоків.

Визначення відношення C/N для середовища Гаузе № 1 проводилося шляхом обрахунку молярних відношень Карбону і Нітрогену в складі середовища (агар-агар в розрахунок не приймався). Для оцінки відношення C/N в МПА, за відсутності досяжної інформації по білках тваринного походження, довелося звертатися до роботи, де було оцінено елементні співвідношення у вірусних білках [6].

Статистичне опрацювання отриманих результатів здійснювали за допомогою стандартних статистичних методів, визначаючи середнє арифметичне отриманих значень та середнє квадратичне відхилення, а візуалізацію – за допомогою програмного пакету Excel.

Результати дослідження та їх обговорення

Дані аналізу жирнокислотних профілів, результати якого включають видову ідентифікацію досліджених штамів за допомогою системи MIDI Sherlock та розраховані для них індекси HAI та a15/i15, наведено на таблицях 1 і 2. З 25 штамів 19 ідентифіковано як види роду *Bacillus*, 5 як *Priestia* та один як *Paenibacillus* [2].

Профіль жирних кислот, що входять до складу мембранних ліпідів, є одним з засобів адаптації бактерій до змін навколишнього середовища і в першу чергу – до змін температури, відповідно до яких змінюється плинність цитоплазматичної мембрани. Індекси HAI та a15/i15 засновані на обчисленні співвідношення між частками типів жирних кислот, які протилежним чином впливають на залежність плинності мембран від температури. Значення HAI



Таблиця 1
Table 1Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів психрофільних бактерій родів *Vacillus* та *Paenibacillus*
Whole cell fatty acid lipid composition of psychrotrophic bacteria of genera *Vacillus* and *Paenibacillus*

Штам	Жирна кислота													HAI	AI5/i15
	n14:0	n16:0	i14:0	i15:0	i16:0	i17:0	a15:0	a17:0	n16:1 ω11c	i17:1 ω10c	16:1ω7 calcohol				
<i>Bacillus subtilis</i> 212	1,47	2,33	5,37	24,98	2,06	0,87	56,43	1,69	1,81	0,32	1,14		0,604	2,259	
<i>B. subtilis</i> 231	0,00	7,45	0,84	16,10	2,93	11,61	39,90	15,34	1,90	1,64	0,00		0,662	2,478	
<i>B. subtilis</i> B	0,60	5,65	0,87	19,19	2,62	10,69	41,91	12,84	1,69	1,60	0,45		0,677	2,184	
<i>Paenibacillus larvae</i> 018	0,84	8,15	0,91	20,30	2,81	8,73	43,35	11,42	1,07	0,69	0,00		0,738	2,136	
<i>B. atrophacus</i> 200	0,33	2,84	1,13	24,50	3,30	6,38	46,93	11,12	0,81	0,52	0,30		0,645	1,916	
<i>B. subtilis</i> 217	0,00	2,05	1,03	24,55	3,82	7,82	44,40	12,26	0,75	1,17	0,38		0,666	1,809	
<i>B. subtilis</i> 203	0,21	1,76	1,19	25,34	3,61	8,91	45,06	10,24	0,50	1,24	0,40		0,714	1,778	
<i>B. subtilis</i> 204	0,00	1,92	1,23	25,13	3,97	8,65	43,26	11,82	0,58	1,55	0,00		0,715	1,721	
<i>B. subtilis</i> 053	0,30	2,08	1,42	26,80	3,56	7,21	45,27	9,23	0,85	1,19	0,48		0,726	1,689	
<i>B. subtilis</i> 1	0,00	2,06	1,21	25,86	3,29	8,84	42,37	10,07	1,15	2,41	0,82		0,726	1,638	
<i>B. subtilis</i> 1223	0,00	1,64	1,24	27,72	3,46	6,88	43,53	9,31	0,60	1,25	0,51		0,742	1,570	
<i>B. subtilis</i> 021	0,66	6,39	1,00	23,38	2,79	8,74	43,94	9,75	1,03	0,85	0,00		0,773	1,879	
<i>B. subtilis</i> 013	0,00	2,20	1,14	28,93	3,47	9,72	40,03	10,26	0,87	1,56	0,47		0,855	1,384	



Таблиця 2
Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів мезофільних та термотолерантних бактерій родів *Bacillus* та *Priestia*
Table 2

Whole cell lipid composition of mesophilic and thermotolerant bacteria of genera *Bacillus* and *Priestia*

Штам	Жирна кислота													HAI	AI5/i15	
	n14:0	n16:0	i14:0	i15:0	i16:0	i17:0	a15:0	a17:0	n16:1 ω11c	i17:1 ω10c	16:1 ω7 calchohol					
Мезофільні	<i>Bacillus subtilis</i> 219	0,22	1,63	1,05	32,54	2,33	10,01	39,54	7,21	0,77	2,10	0,52			0,953	1,215
	<i>B. pumilus</i> 229	0,37	1,59	0,61	38,93	2,29	5,36	40,44	8,44	0,18	0,36	0,18			0,991	1,039
	<i>Priestia megaterium</i> 036	0,49	1,71	0,75	39,61	2,34	4,40	42,08	6,77	0,15	0,25	0,14			0,998	1,062
	<i>B. subtilis</i> 247	0,70	5,00	1,28	29,80	3,03	9,60	38,77	8,05	1,27	1,21	0,00			1,002	1,301
	<i>B. pumilus</i> 049	0,38	1,58	0,76	39,42	2,81	5,04	40,14	7,83	0,21	0,38	0,20			1,025	1,018
Термотолерантні	<i>P. megaterium</i> 054	0,00	1,74	0,47	41,32	2,06	5,33	39,50	8,31	0,00	0,00	0,00			1,065	0,956
	<i>B. pumilus</i> A	0,43	1,63	0,80	40,25	2,80	5,25	39,55	7,46	0,23	0,38	0,21			1,070	0,983
	<i>B. pumilus</i> 041	0,39	1,77	0,62	40,60	2,66	5,95	37,95	8,58	0,00	0,30	0,00			1,110	0,935
	<i>P. megaterium</i> 63	0,34	1,70	0,60	42,38	2,58	5,01	38,34	7,75	0,00	0,27	0,00			1,135	0,905
	<i>B. licheniformis</i> 048	0,33	2,08	0,54	42,51	2,38	6,00	36,32	8,47	0,00	0,44	0,00			1,190	0,854
	<i>P. megaterium</i> 051	0,31	1,59	0,44	45,66	1,70	5,57	35,53	7,17	0,00	0,52	0,00			1,279	0,778
	<i>P. megaterium</i> 055	0,33	1,20	0,63	51,86	1,80	3,60	33,47	4,64	0,29	0,58	0,24			1,515	0,645



близьке до одиниці властиве мезофільним штамам, більше за одиницю – термофільним та менше за одиницю, відповідно, психрофільним. Відповідно, мезофільні штами демонструють значення відношення a_{15}/i_{15} між 1 та 3; значення цього показника, що перевищують 3, властиві психрофільним штамам (оскільки надлишок антеізо-С15 жирної кислоти надає мембрані плинності за нижчих температур [4]), а менші за одиницю – термофільним штамам.

Як мезофіли в роботі було інтерпретовано штами зі значеннями NAI $1 \pm 0,1$ [4]. Показник a_{15}/i_{15} , хоча і пов'язаний з NAI , не дає змоги так само чітко розділити досліджувані штами на групи, оскільки в жодному випадку не приймає значень, щоб дорівнювали 3 або перевищували це число. Проте його використання підтверджує релевантність виділення за показником NAI групи термотолерантних штамів у повному її складі (всі штами, NAI яких перевищує 1,1, також мають $a_{15}/i_{15} < 1$) та дає засади умовно поділити численну групу психротрофних штамів на психротрофних та «глибоко психротрофних», серед яких останні відрізняються за значенням a_{15}/i_{15} вищим за 2.

З 25 досліджених штамів до термотолерантного термотипу було віднесено 5 штамів, до мезофільного – 7, решта виявилися психротрофами. «Глибоко психротрофними» вважали 4 штами, а саме: 212, 231, В та 018. Велика частка психротрофних штамів не узгоджується із висловленою нами раніше гіпотезою про алохтонність аеробних спорогенів для донних відкладень сірководневої зони Чорного моря, але може бути артефактом, оскільки штами для даного дослідження було відібрано за наявністю високої антимікробної активності з колекції зі 148 штамів [3, 12].

Результати скринінгу на наявність антагоністичної активності у досліджуваних штамів представлено на графіках (рис. 1–6) та таблицях (табл. 3, 4). На графіках представлено лише дані для штамів, що демонстрували за принаймні однієї температури культивування антагоністичну активність, яка реєструється, та її значення було статистично достовірно відмінним за різних температур культивування.

З групи термотолерантних штамів всі досліджені штами показали антагоністичну активність по відношенню до *S. aureus*, і лише 3 – до *E. coli*. Слід відзначити, що за культивування на МПА, антагоністична активність до *E. coli* у всіх термотолерантних штамів взагалі була відсутня.

За вищої температури культивування на середовищі Гаузе № 1 антагоністична активність всіх досліджуваних штамів до *S. aureus* була меншою. А у двох штамів з трьох активних проти *E. coli* за тих самих умов – вищою, ніж за культивування при 30 °С (рис. 1).

Результати того ж дослідження на більш багатому середовищі МПА виявилися менш показовими – як зазначалося раніше, жоден термотолерантний штам не продемонстрував антагоністичну активність проти *E. coli*. По відношенню до *S. aureus* лише три з п'яти штамів показали більш низьку антагоністичну активність і один (048) навіть демонстрував більш високу антагоністичну активність за 37 °С, ніж за 30 °С (рис. 2). Рівень антагоністичної активності штаму 041 значущих відмінностей за різних температур культивування не продемонстрував.



Таблиця 3

Антагоністична активність психротрофних штамів по відношенню до *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*

Table 3

Antagonistic activity of psychrotrophic strains against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Штам	Середовище Гаузе №1		Середовище МПА		
	30 °С	37 °С	30 °С	37 °С	
Тест-штам: <i>S. aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 212	22±0,0	23±0,0	14,5±0,5	14,5±0,5
	<i>B. subtilis</i> 231	21±1,0	20±1,0	19±1,0	14,5±1,0
	<i>B. subtilis</i> B	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Paenibacillus larvae</i> 018	20±0,0	20±0,0	18±0,0	12±0,0
	<i>B. atrophaeus</i> 200	17,5±2,5	22±0,0	20±0,0	11,5±0,5
	<i>B. subtilis</i> 217	19±1,0	15,5±1,0	22±0,0	9±0,0
	<i>B. subtilis</i> 203	16±4,0	18±1,0	14±0,0	8,5±0,5
	<i>B. subtilis</i> 204	18±0,0	16,5±1,5	15±0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 053	20±0,0	20±0,0	10,5±1,5	17±1,5
	<i>B. subtilis</i> 1	18±0,0	21,5±0,0	12±1,0	10±1,0
	<i>B. subtilis</i> 1223	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 021	20±0,0	21±0,0	16±0,0	10±0,0
	<i>B. subtilis</i> 013	19±1,0	21,5±0,5	14,5±0,5	10,5±0,5
Тест-штам: <i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i> 212	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 231	4±0,5	7±0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> B	12±0,0	12,5±0,5	7±0,0	7±0,0
	<i>P. larvae</i> 018	13,5±0,5	13±1,0	13±1,0	9±0,0
	<i>B. atrophaeus</i> 200	10,5±0,5	13±0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 217	0,0	10±1,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 203	10,5±0,5	11±1,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 204	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 053	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 1	13,5±0,5	15±0,0	9±0,0	9±0,0
	<i>B. subtilis</i> 1223	8±1,0	11±0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 021	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>B. subtilis</i> 013	13±1,0	12±0,0	9±0,0	0,0

Примітка: Результати наведено в міліметрах. Після ± наведено середнє квадратичне відхилення.

Note: Result are given in millimeters. After ± are given standart deviations.



Таблиця 4

Антагоністична активність мезофільних та термотолерантних штамів
по відношенню до *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*

Table 4

Antagonistic activity of mesophilic and thermotolerant strains against
Staphylococcus aureus and *Escherichia coli*

Штам		Середовище Гаузе №1		Середовище МПА		
		30 °C	37 °C	30 °C	37 °C	
Мезофільні	Тест-штам: <i>S. aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 219	17±0,0	16±2,0	12±0,0	11±2,0
		<i>B. pumilus</i> 229	12,5±0,5	0,0	14,5±0,5	0,0
		<i>Priestia megaterium</i> 036	20±0,0	20±0,0	20±0,0	12±0,0
		<i>B. subtilis</i> 247	17±1,0	16,5±0,5	12±0,0	8,5±0,5
		<i>B. pumilus</i> 049	19±1,0	11±1,0	20±0,0	10,5±0,5
		<i>P. megaterium</i> 054	20,5±0,5	15±1,0	18±0,0	11,5±0,5
		<i>B. pumilus</i> A	21,5±1,5	15±0,0	21±1,0	14±0,0
	Тест-штам: <i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i> 219	10,5±0,5	10,5±0,5	0,0	0,0
		<i>B. pumilus</i> 229	13,5±0,5	10,5±0,5	12,5±0,5	7±0,0
		<i>P. megaterium</i> 036	11,5±0,5	12,5±1,5	11,5±0,5	12±0,0
		<i>B. subtilis</i> 247	11,5±0,5	9,5±1,5	0,0	7±0,0
		<i>B. pumilus</i> 049	8±0,0	9±1,0	0,0	0,0
		<i>P. megaterium</i> 054	0,0	0,0	12±1,0	0,0
		<i>B. pumilus</i> A	0,0	0,0	0,0	0,0
Термотолерантні	Тест-штам: <i>S. aureus</i>	<i>Priestia megaterium</i> 055	15,5±0,5	13,5±0,5	15,5±0,5	10,5±0,5
		<i>P. megaterium</i> 051	19,5±0,5	17±1,0	16±0,0	11,5±0,5
		<i>P. megaterium</i> 63	15,5±0,5	9±0,0	14,5±0,5	10±1,0
		<i>B. pumilus</i> 041	15±0,0	11,5±0,5	15,5±4,5	16,5±0,5
		<i>B. licheniformis</i> 048	18,5±0,5	11,5±0,5	10±0,0	14±3,0
	Тест-штам: <i>E. coli</i>	<i>B. pumilus</i> 041	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>P. megaterium</i> 63	0,0	0,0	0,0	0,0
		<i>B. licheniformis</i> 048	4,5±0,5	9±0,0	0,0	0,0
		<i>P. megaterium</i> 051	11,5±0,0	11,5±0,0	0,0	0,0
		<i>P. megaterium</i> 055	0,0	9,5±0,5	0,0	0,0

Примітка: Результати наведено в міліметрах. Після ± наведено середнє квадратичне відхилення.

Note: Result are given in millimeters. After ± are given standart deviations.



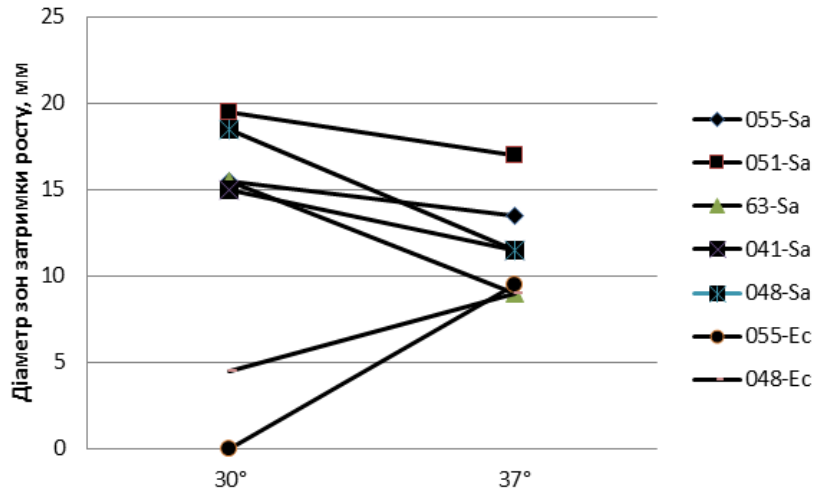


Рис. 1. Антагоністична активність бактерій термотолерантних штамів на середовищі Гаузе № 1 за температур 30 °С і 37 °С

Примітка: Колонка справа – номери штамів, Sa – антагоністична активність проти *Staphylococcus aureus*, Ec – активність проти *Escherichia coli*

Fig. 1. Antagonistic activity of bacteria of thermotolerant strains on Gauze № 1 medium at temperatures 30 °C і 37 °C

Note: Right column – strain numbers, Sa – antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, Ec – activity against *Escherichia coli*

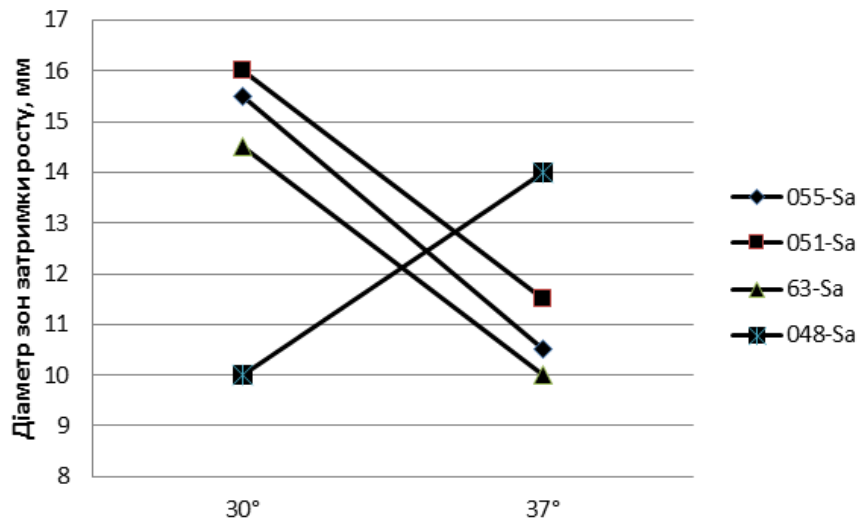


Рис. 2. Антагоністична активність бактерій термотолерантних штамів на середовищі МПА за температур 30 °С і 37 °С

Примітка: Колонка справа – номери штамів, Sa – антагоністична активність проти *Staphylococcus aureus*

Fig. 2. Antagonistic activity of bacteria of thermotolerant strains on Nutrient agar medium at temperatures 30 °C і 37 °C

Note: Right column – strain numbers, Sa – antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*



Антагоністична активність серед мезофільних штамів навіть більш виражена. Всі досліджені штами демонструють антагоністичну активність по відношенню до *S. aureus* хоча б за одного режиму культивування. По відношенню до *E. coli* неактивним за всіх дослідних умов виявився лише один штам – А (рис. 3, 4).

Антагоністична активність по відношенню до *S. aureus* добре виражена на обох середовищах, що були використані в роботі. За вищої температури культивування на середовищі Гаузе № 1 вона була достовірно відмінною лише в 4 з 7 штамів і при тому меншою (рис. 3). Штам 229 повністю втрачає антагоністичну активність по відношенню до *S. aureus* при температурі 37 °С як на Гаузе № 1, так і на МПА (рис. 3, 4). Цей самий штам є єдиним, який за тих самих умов дещо змінює антагоністичну активність на Гаузе № 1 до *E. coli* – також у бік зменшення.

Антагоністична активність мезофільних штамів до *E. coli* при 37 °С у порівнянні з такою за 30 °С знижується тільки у штаму 229 на Гаузе № 1 (рис. 3), та двох (229 і 54) на МПА. Лише в штаму 247 ця зміна є позитивною (на МПА, рис. 4).

Залежність антагоністичної активності психротрофних штамів від умов культивування виявилася певною мірою неочікуваною. З 13 досліджених психротрофних штамів за культивування на Гаузе № 1 антагоністичну активність до хоча б одного з індикаторних штамів проявили всі досліджені штами. Її значення при температурі 37 °С виявилось вищим за антагоністичну активність при 30 °С у 6 штамів до *S. aureus* та у чотирьох до *E. coli* (рис. 5). Відмітимо штам 217, який на Гаузе № 1 при 37 °С з неактивного до *E. coli* став активним.

Натомість картина, що спостерігається за культивування психротрофних тест-штамів на МПА, принципово схожа на таку, що спостерігалася для штамів більш термофільних термотипів. Для 10 з 11 штамів, для яких помітна умовна зміна антагоністичної активності з ростом температури, її характер негативний (рис. 6). Штами 204 та 013 навіть повністю втрачають антагоністичну активність при 37 °С.

Характер зміни антагоністичної активності штамів, що було нами віднесено до категорії «глибоких психротрофів», тобто таких, що мають показники жирнокислотних профілів дуже близькі до таких у психрофілів, в цілому вписується в тенденцію, яку демонструє більшість досліджених нами психротрофних штамів у відповідних умовах. Так, на середовищі Гаузе № 1 штами 212 та 231 демонструють підвищення антагоністичної активності з ростом температури, а на МПА штами 231 та 018 – її зниження.

Залежність характеру антагоністичної активності від термотипу в даному дослідженні виявилася залежною також від складу середовища. Це особливо цікаво у випадку двох досить різних за складом середовищ, як Гаузе № 1 та МПА, які було використано в даній роботі. Серед відмінностей цих середовищ найбільш глобальною можна назвати їх відмінність по молярному відношенню C/N, яке для Гаузе № 1 сягає приблизно 66, а для МПА, за непрямою оцінкою [6], може бути в межах 2,9–3,4.

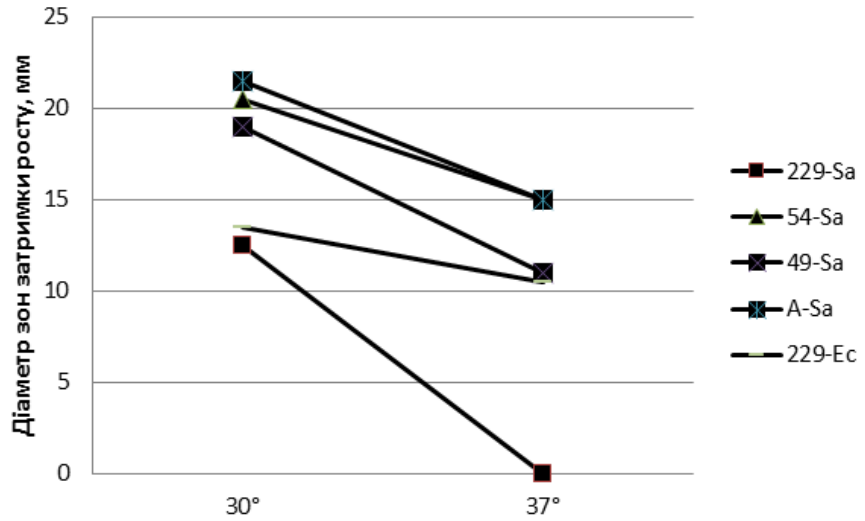


Рис. 3. Антагоністична активність бактерій мезофільних штамів на середовищі Гаузе № 1 за температур 30 °С і 37 °С
 Примітка: Колонка справа – номери штамів, Sa – антагоністична активність проти *Staphylococcus aureus*, Ec – активність проти *Escherichia coli*

Fig. 3. Antagonistic activity of bacteria of mesophilic strains on Gauze № 1 medium at temperatures 30 °C i 37 °C
 Note: Right column – strain numbers, Sa – antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, Ec – activity against *Escherichia coli*

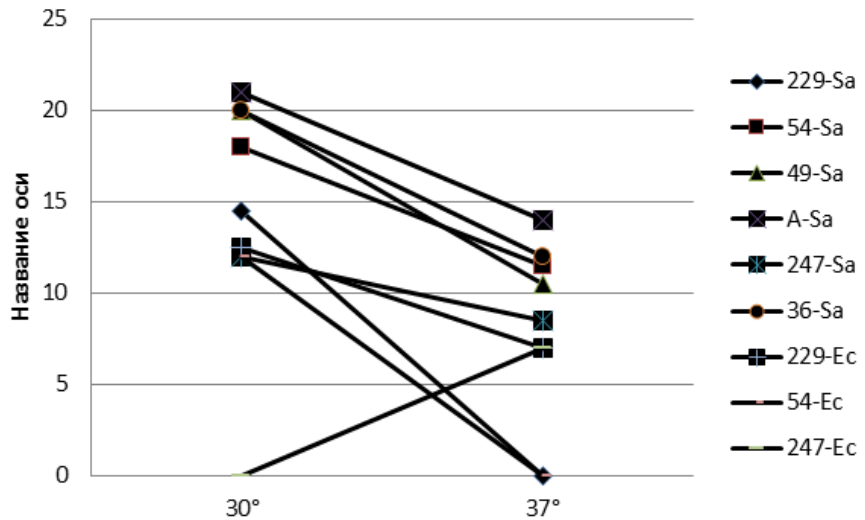


Рис. 4. Антагоністична активність бактерій мезофільних штамів на середовищі МПА за температур 30 °С і 37 °С
 Примітка: Колонка справа – номери штамів, Sa – антагоністична активність проти *Staphylococcus aureus*, Ec – активність проти *Escherichia coli*

Fig. 4. Antagonistic activity of bacteria of mesophilic strains on Nutrient Agar medium at temperatures 30 °C i 37 °C
 Note: Right column – strain numbers, Sa – antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, Ec – activity against *Escherichia coli*



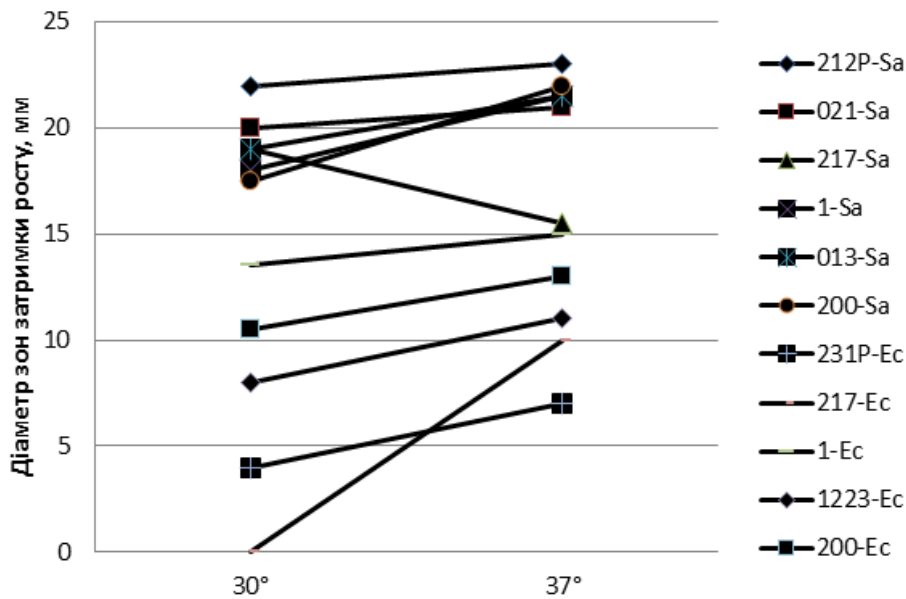


Рис. 5. Антагоністична активність бактерій психротрофних штамів на середовищі Гаузе № 1 за температур 30 °C і 37 °C

Примітка: Колонка справа – номери штамів, Sa – антагоністична активність проти *Staphylococcus aureus*, Ec – активність проти *Escherichia coli*. P після номеру штаму – «глибокий психротроф»

Fig. 5. Antagonistic activity of bacteria of psychrotrophic strains on Gauze № 1 medium at temperatures 30 °C і 37 °C

Note: Right column – strain numbers, Sa – antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, Ec – activity against *Escherichia coli*. P after a strain number – “deep psychrotrophe”

З екофізіологічної точки зору спостережений результат можна пояснити тим, що для термотолерантних і мезофільних бактерій температура, що дорівнює 37 °C, не є значним виходом за межі температурного оптимуму. Тут варто пригадати, що психротрофи даної колекції є мезотолерантними, оскільки їх виділення проводилося за температури 25 °C в рамках іншої роботи. І лише на бідному на чинники росту, проте з високим відношенням C/N середовищі, умови за культивування при 37 °C виявляються досить екстремальними для даних організмів, аби це призвело до активації додаткових механізмів конкуренції за типом секреції антибактеріальних сполук. Вираженість даного ефекту саме на середовищі Гаузе № 1 може свідчити про участь у ньому сполук класу полікетидів, синтез яких не потребує високої кількості Нітрогену у середовищі [8]; також відомий випадок одночасної продукції сурфактину, ліхенізину, ітуруину та ряду фенгіцинів за культивування на синтетичному середовищі з 20% глюкози та сумарно 4% нітрогенвмісних сполук [10]. Аналогічним чином можна пояснити антагоністичну активність до широкого спектру бактерій ізоляту *Bacillus subtilis* MIR 15 з аргентинського ґрунту, яку він демонстрував за температури культивування 37 °C, попри типовий оптимум для представників даного виду [7, 9].

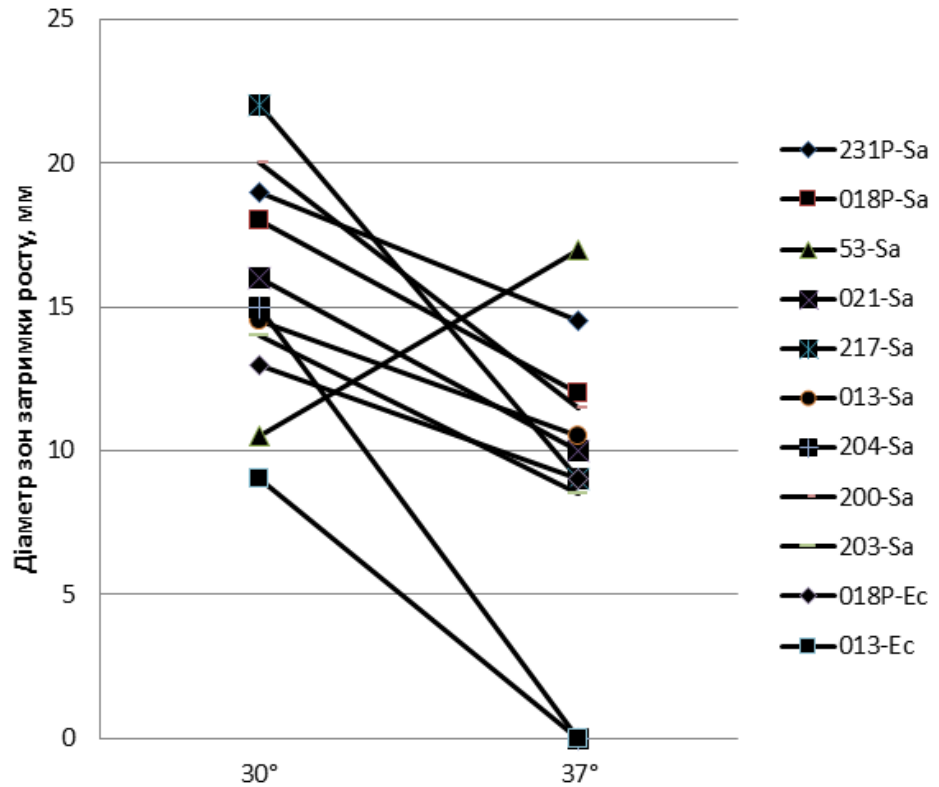


Рис. 6. Антагоністичну активність бактерій психротрофних штамів на середовищі МПА за температур 30 °С і 37 °С

Примітка: Колонка справа – номери штамів, Sa – антагоністична активність проти *Staphylococcus aureus*, Ec – активність проти *Escherichia coli*

Fig. 6. Antagonistic activity of bacteria of psychrotrophic strains on Nutrient Agar medium at temperatures 30 °C і 37 °C

Note: Right column – strain numbers, Sa – antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, Ec – activity against *Escherichia coli*

Встановлено, що належність до певного термотипу впливає на характер антагоністичної активності споротвірних бактерій. Термотолерантні та мезофільні бактерії демонструють більш низьку антагоністичну активність на різних середовищах при температурі 37 °С, ніж за 30 °С. Антагоністична активність психротрофних бактерій за умов культивування при більш високій температурі та на середовищі Гаузе № 1 є вищою; можливо, це зумовлено поєднанням чинників неоптимальної температури для росту та високим відношенням C/N у середовищі, що може сприяти синтезу полікетидних антибіотиків.



M.D. Shtenikov, O.Y. Zinchenko, V.V. Boldyreva

Odesa Mechnykov National University
Dvorianska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: shtenikovn@onu.edu.ua

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF MARINE BACTERIA OF *BACILLUS*, *PRIESTIA* AND *PAENIBACILLUS* GENERA OF DIFFERENT THERMOTYPES

Summary

Aim. To study the antagonistic activity of bacteria of genera *Bacillus*, *Priestia* and *Paenibacillus* at different conditions of cultivation. **Methods.** Antagonistically active spore-forming bacteria isolated from deep-sea bottom sediments of the Black Sea were used for the study. Determination of thermotypes was performed using the results of analysis of fatty acid profile parameters. Antagonistic activity to test strains of bacterial opportunistic pathogens was detected by the method of agar blocks on Gauze № 1 and Nutrient Agar media at different cultivation temperatures. **Results.** Aerobic bacilli of genera *Bacillus*, *Priestia* and *Paenibacillus* of all three thermotypes – thermotolerants, mesophiles and psychrotrophes, in general show lower antagonistic activity when cultured at 37 °C on both media, except for a marked increase in psychrotrophe antagonistic activity at 37 °C on Gauze № 1. **Conclusions.** It was established that belonging to a certain thermotype affects the character of the antagonistic activity of sporeforming bacteria. The antagonistic activity of mesophilic and thermotolerant bacteria at a higher temperature of cultivation is lower, and that of psychrotrophic bacteria at a higher temperature and on Gauze № 1 medium is higher.

Key words: *Bacillus*, *Paenibacillus*, antagonistic activity, marine bacteria, thermotypes

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білай В.І. Методи експериментальної мікології. – Київ: Наукова думка, 1982. – С. 272.
2. Іваниця В.О., Штеніков М.Д., Остапчук А.М. Факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії глибоководних відкладень чорного моря // *Microbiology & Biotechnology*. – 2017. – Vol. 40, № 4. – P. 94–103.
3. Штеніков М.Д. Аеробні споротвірні бактерії глибоководних осадов Чорного моря: Автореф. дис. на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. Одеса, 2020. – 26 с.
4. Diomandé S.E., Nguyen-The C., Guinebretière M.H., Broussolle V., Brillard J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – С. 1–20.
5. Jiménez-Delgado R., Valdés-Rodríguez S.E., Olalde-Portugal V., Abraham-Juárez R., García-Hernández J. L. Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani* // *Revista mexicana de fitopatología*. – 2018. – Vol. 36, № 2. – P. 256–275.
6. Jover L.F., Effler T.C., Buchan A., Wilhelm S.W., Weitz J.S. The elemental composition of virus particles: implications for marine biogeochemical cycles // *Nature Reviews Microbiology*. – 2014. – Vol. 12, № 7. – P. 519–528.



7. Logan N.A, De Vos P. *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Ed Whitman WB. – John Wiley & Sons, Inc, 2015. – P. 1–163
8. Moreira J.V., Seforah C.M.S., Cremasco M.A. Evaluation of carbon: nitrogen ratio in semi-defined culture medium to tacrolimus biosynthesis by *Streptomyces tsukubaensis* and the effect on bacterial growth // *Biotechnology Reports*. – 2020. – Vol. 26. – P: e00440.
9. Perez C., Suarez C., Castro G.R. Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15 // *Journal of biotechnology*. – 1992. – Vol. 26, № (2–3) . – P. 331–336.
10. Pueyo M.T., Bloch C., Carmona-Ribeiro A.M., Di Mascio P. Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain // *Microbial ecology*. – 2009. – Vol. 57, N2. – P. 367–378.
11. Sasser M. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids, Technical Note 101. – Newark, DE:MIDI, 1990. – P. 1–7.
12. Shtenikov M.D., Ostapchuk A.M., Ivanytsia V.O. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black Sea sediments // *Microbiology & Biotechnology*. – 2018. – Vol. 43, № 3. – P. 82–89.
13. Šimunović K., Stefanic P., Klančnik A., Erega A., Mandic Mulec I., Možina S.S. *Bacillus subtilis* PS-216 Antagonistic Activities against *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 Are Modulated by Temperature, Oxygen, and Growth Medium // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10, № 2. – P. 289.
14. Sulis G., Sayood S., Gandra S. Antimicrobial resistance in low-and middle-income countries: current status and future directions // *Expert review of anti-infective therapy*. – 2022. – Vol. 20, № 2. – P. 147–160.
15. 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*. – 2018. – Vol. 55. – P. 385–441.
16. Yang R., Lei S., Xu X., Jin H., Sun H. et al. Key elements and regulation strategies of NRPSs for biosynthesis of lipopeptides by *Bacillus* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 104, № 19. – P. 8077–8087.
17. 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. – Vol. 17, № 1. – P. 1–18.

REFERENCES

1. Bilaj VI. Metody eksperimentalnoj mikologii [Methods of Experimental Mycology]. Kyiv: Naukova dumka, 1982:272 (in Russian)
2. Ivanytsia VO, Shtenikov MD, Ostapchuk AM. Facultatively-anaerobic endosporeforming bacteria of deep water bottom sediments of Black sea. *Microbiology & Biotechnology*. 2017;40(4):94–103. (in Ukrainian)
3. Shtenikov MD. Aerobic spore-forming bacteria of deep-water sediments of the Black Sea. Qualifying scientific work on the rights of the manuscript. Odesa, 2020:26 (in Ukrainian)



4. Diomandé SE, Nguyen-The C, Guinebretière MH, Broussolle V, Brillard J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Front. Microbiol.* 2015;(6):1–20.
5. Jiménez-Delgadillo R, Valdés-Rodríguez SE, Olalde-Portugal V, Abraham-Juárez R, García-Hernández JL. Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*. *Revista mexicana de fitopatología.* 2018;36(2):256–275.
6. Jover LF, Effler TC, Buchan A, Wilhelm SW, Weitz JS. The elemental composition of virus particles: implications for marine biogeochemical cycles. *Nature Reviews Microbiology.* 2014;12(7):519–528.
7. Logan N. A, De Vos P. *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* Ed Whitman WB. John Wiley & Sons, Inc, 2015:1–163
8. Moreira JV, Seforah CMS, Cremasco MA. Evaluation of carbon: nitrogen ratio in semi-defined culture medium to tacrolimus biosynthesis by *Streptomyces tsukubaensis* and the effect on bacterial growth. *Biotechnology Reports.* 2020;26:e00440.
9. Perez C, Suarez C, Castro GR. Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15. *Journal of biotechnology.* 1992;26(2-3):331–336.
10. Pueyo MT, Bloch C, Carmona-Ribeiro AM, Di Mascio P. Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. *Microbial ecology.* 2009;57(2):367–378.
11. Sasser M. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular FattyAcids, Technical Note 101. Newark, DE:MIDI; 1990:1–7.
12. Shtenikov MD, Ostapchuk AM, Ivanytsia VO. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black Sea sediments. *Microbiology & Biotechnology.* 2018;43(3):82–89.
13. Šimunović K, Stefanic P, Klančnik A, Erega A, Mandic Mulec I, Možina SS. *Bacillus subtilis* PS-216 Antagonistic Activities against *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 Are Modulated by Temperature, Oxygen, and Growth Medium. *Microorganisms.* 2022;10(2):289.
14. Sulis G, Sayood S, Gandra S. Antimicrobial resistance in low-and middle-income countries: current status and future directions. *Expert review of anti-infective therapy.* 2022;20(2):147–160.
15. Tyurin AP, Efimenko TA, Prokhorenko IA, Rogozhin EA, Malanicheva I A, Zenkova VA. Amicoumacins and Related Compounds: Chemistry and Biology // *Studies in Natural Products Chemistry.* Elsevier, 2018;55:385–441.
16. Yang R, Lei S, Xu X, Jin H, Sun H et al. Key elements and regulation strategies of NRPSs for biosynthesis of lipopeptides by *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2020;104(19):8077–8087.
17. Zhao X, Kuipers OP. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics.* 2016;17(1):1–18.

Стаття надійшла до редакції 31.07.2022 р.

