

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І.І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

Дипломна робота

бакалавра

на тему: «Бацили Чорного моря як джерело нових антибіотичних речовин»

Bacilli of the Black Sea as a source of new antibiotic substances

Виконав: студент IV курсу
денної форми навчання
Спеціальність 162 Біотехнології та
біоінженерія
Болдирєва Валерія Володимирівна

Науковий керівник
кандидат біологічних наук, доцент
Зінченко Оксана Юріївна

Рецензент:
кандидат біологічних наук, доцент
Майкова Г.В.

Рекомендовано до захисту:

Протокол засідання кафедри

№ _____ від «___» _____ р.

(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Захищено на засіданні ЕК № _____

Протокол № _____ від «___» _____ р.

Оцінка _____ / _____ / _____

Завідувач кафедри

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Голова ЕК

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Одеса - 2021

АНОТАЦІЯ

Експериментальну частину роботи присвячено розробці біотехнології отримання антимікробних сполук зі спороутворюючих бактерій – мешканців Чорного моря.

Визначено антагоністичну активність 27 культур бактерій, що належать до 2 родів спороутворюючих бактерій – *Bacillus* (5 видів) та *Paenibacillus* (1 вид) щодо *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 та *Candida albicans* ATCC 18804, за культивування на середовищах Гаузе-1 та МПА за різних температурних режимів. Найвищу чутливість до антимікробних сполук досліджуваних штамів виявлено у культури *S. aureus* ATCC 25923 Оптимальними умовами для синтезу метаболітів, активних щодо грампозитивних бактерій, було культивування на середовищі Гаузе-1 за температури 30 °С. Активність щодо *E. coli* ATCC 25922 була вищою на середовищі Гаузе-1, вплив температури був штамоспецифічним. Синтез метаболітів з антифунгальними властивостями відбувався більш активно на середовищі МПА, температурний режим на цей процес не впливав. Серед досліджуваних культур не виявлено антагоністу всіх тест-штамів. У результаті роботи розроблено біотехнологію отримання антимікробних сполук зі спороутворюючих бактерій Чорного моря.

Курсову роботу «Бацили Чорного Моря як джерело нових антибіотичних речовин» викладено на 46 сторінках друкованого тексту. В роботі наведено посилання на 11 публікацій кирилицею та 32 латиницею.

Ключові слова: спороутворюючі бактерії, антимікробні метаболіти, умовно-патогенні мікроорганізми.

The experimental part of the work is devoted to the development of biotechnology for the production of antimicrobial compounds from spore-forming bacteria - inhabitants of the Black Sea.

Antagonistic activity of 27 cultures of bacteria belonging to 2 genera of spore-forming bacteria - *Bacillus* (5 species) and *Paenibacillus* (1 species) against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 18804, was determined at different temperatures. The highest sensitivity to antimicrobial compounds of the studied strains was found in the culture of *S. aureus* ATCC 25923 The optimal conditions for the synthesis of metabolites active against gram-positive bacteria was cultivation on Gause medium 1 at a temperature of 30 °C. The activity against *E. coli* ATCC 25922 was higher on Gause medium 1, the effect of temperature was strain-specific. The synthesis of metabolites with antifungal properties was more active on the Nutrient agar medium, the temperature regime did not affect this process. No antagonist of all test strains was detected among the studied cultures. As a result, biotechnology for the production of antimicrobial compounds from spore-forming bacteria of the Black Sea was developed.

The course work «*Bacilli* of the Black Sea as a source of new antibiotic substances» is set out on 46 pages of printed text. The paper provides references to 11 publications in Cyrillic and 32 in Latin.

Key words: spore-forming bacteria, antimicrobial metabolites, opportunistic pathogens.

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП.....	4
1.ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Бацили як продуценти антибіотиків.....	7
1.2. Характеристика пептидних антибіотиків.....	10
1.3. Класифікація пептидних антибіотиків.....	11
1.3.1.Класифікація пептидних антибіотиків за механізмом дії і хімічною будовою.....	12
1.3.2.Класифікація за механізмом біосинтезу.....	14
1.3.2.1.Нерибосомно синтезовані пептидні антибіотики.....	14
1.3.2.2.Рибосомно синтезовані пептидні антибіотики.....	16
2.МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	19
2.1.Місце та матеріали дослідження.....	19
2.2.Визначення здатності досліджуваних культур до продукування антибіотичних речовин.....	20
2.3.Технологічна схема отримання метаболітів представників р. <i>Bacillus</i> з антимікробними властивостями.....	22
3.РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	25
3.1.Антагоністична активність досліджуваних штамів щодо <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	24
3.2. Антагоністична активність досліджуваних штамів щодо <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	28
3.3. Антагоністична активність досліджуваних штамів щодо <i>Candida albicans</i> ATCC 18804.....	32
3.4. Прогнозування можливого спектру антимікробних метаболітів досліджених мікроорганізмів.....	38
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	41

ВСТУП

У даний час у науковій літературі є недостатня кількість публікацій, присвячених питанням вивчення і біотехнологічного виробництва різних видів біологічно активних речовин, що продукуються переважно спороутворюючими мікроорганізмами роду *Bacillus*. В цілому увага дослідників звернена на деякі конкретні види біологічно активних речовин, способи їх виділення, опис фізико-хімічних і біохімічних властивостей, рідше – на їх специфічний вплив і фізіологічну значущість по відношенню до різних тканин, органів і систем людського організму.

Пошук і вивчення нових природних біологічно активних речовин залишається одним з важливих напрямків сучасної біології та біотехнології. З багатьох вторинних метаболітів, утворюваних мікроорганізмами, найбільше практичне значення, як і раніше, мають антибіотики, що широко застосовуються у медицині.

Швидке настання резистентності знижує ефективність більшості звичайних протимікробних препаратів і є загальною проблемою, що турбує сучасне людство. Таким чином, існує великий попит на постійне винайдення нових антибіотиків для боротьби з цією проблемою.

На шляху подолання зростаючої загрози інфекційних захворювань для людини природні продукти мікробного походження виявляються найбільш сприятливою альтернативою сучасним антибіотикам. У цьому відношенні антимікробні пептиди (АМП) різних видів *Bacillus* є ідеальними терапевтичними засобами через їх широкий спектр та інколи незвичайні механізми дії [Brogden et al., 2011].

Антимікробні сполуки спороутворюючих бактерій мають багатообіцяючий потенціал у боротьбі зі швидким поширенням мікробної резистентності до звичайних антибіотиків [Rotem et al., 2009]. На сьогоднішній день ідентифіковано понад 2000 різних АМП з безлічі рослин, тварин, вірусів, бактерій та грибів, і деякі з цих сполук знаходяться на стадії клінічних випробувань [Brogden et al., 2011]. Оскільки АМП є природною частиною

антимікробної захисної системи людини, можливість розвитку стійкості до патогенів або небажаних побічних ефектів є менш імовірною, ніж при застосуванні хімічних антибіотиків. Більше того, у порівнянні зі звичайними антибіотиками, які в основному активні щодо бактерій або грибів, АМП вважаються групою нових антибактеріальних, протигрибкових та противірусних препаратів, які можуть бути використані для лікування інфекційних захворювань та паразитарних інфекцій, а також можуть застосовуватися для лікування раку та ВІЛ-інфекції [Jenssen et al., 2006]. Крім того, звичайні антибіотики, як правило, націлені на метаболічні ферменти, які можуть вибірково розвивати резистентність, тоді як АМП вбивають мікроорганізми головним чином шляхом утворення мембранних пор, тим самим ускладнюючи для організмів розвиток стійкості [Sang et al., 2008]. Представники роду *Bacillus* та споріднені мікроорганізми здатні продукувати велику кількість АМП, і тому розглядається як перспективна відправна точка у пошуку нових інгібувальних речовин [Bizani et al., 2005].

Важлива особливість бацил полягає в тому, що добре вивчена їх генетика [Kunst et al., 1997] і тому вони є перспективною системою для клонування чужорідних генів. Наразі методами генетичної інженерії на основі аеробних спороутворюючих бактерій отримані суперпродуценти різних біологічно активних сполук (антибіотики, бактеріоцини, ферменти тощо). Це відкриває перспективи для конструювання на основі бацил штамів із заданими властивостями.

Метою роботи була розробка біотехнології отримання антимікробних сполук зі спороутворюючих бактерій – мешканців Чорного моря.

У відповідності до поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1. Дослідити антагоністичну активність спороутворюючих бактерій, виділених з донних осадів Чорного моря щодо умовно-патогенних мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 та *C. albicans* ATCC 18804.

2. Визначити вплив складу середовища та температурного режиму на біосинтетичну активність досліджуваних культур.
3. Здійснити інформаційний пошук в біологічних базах даних та визначити можливий спектр продукованих метаболітів досліджуваних штамів.
4. Розробити біотехнологічну схему отримання антимікробних метаболітів спороутворюючих бактерій.

Об'єкт дослідження – антагоністична активність спороутворюючих бактерій.

Предмет дослідження – розробка біотехнології отримання антимікробних сполук з морських спороутворюючих бактерій.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Бацили як продуценти антибіотиків

Важлива особливість бацил полягає в тому, що добре вивчена їх генетика і тому вони є перспективною системою для клонування чужорідних генів. В даний час методами генетичної інженерії на основі аеробних спороутворюючих бактерій отримані суперпродуценти різних біологічно активних речовин (коліцини E2 і ін). Це відкриває перспективу конструювання на основі бацил штамів із заданими властивостями і використання їх нових властивостей.

У 90-х роках минулого століття в медичній практиці проводилися широкі випробування препарату «Біоспорин» [Теміров та ін., 2004], створеного співробітниками інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, на основі штамів *B. subtilis* ВКПМ № 2335 і *B. licheniformis* ВКПМ № 2336. Було встановлено, що «Біоспорин» більш ефективний у порівнянні не тільки з пробіотиками представників нормального мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту (типу біфідумбактерину, лактобактерина або колібактерину), але і в порівнянні з препаратами на основі монопрописів спороутворюючих бактерій (бактисубтил, споробактерин) [Федорова др., 2016].

Кількість відомих антибіотиків, що продукуються спороутворюючими аеробними бактеріями, в даний час наближається до 200. За кількістю продукованих антибіотичних речовин мікроорганізми роду *Bacillus* поступаються лише актиноміцетам. У доступній літературі описано понад 70 різних антибіотиків, що продукуються бактеріями роду *Bacillus*. Деякі з них вже широко застосовуються в медицині, ветеринарії, сільському господарстві, харчовій промисловості та ін. Це поліміксини, колістин, бацитрацин, тіротріціновий комплекс (лінійний граміцидін + Тироцидін), граміцидін С, субтілін, едеїн, бутірозін [Федорова и др., 2016].

Таблиця 1

Антибіотики, які продукуються бактеріями роду *Bacillus*

[Marahier et al., 1993]

Вид	Антибіотик
<i>Bacillus brevis</i>	Грамїцидін S
	Тіроцидін
	Лінійний грамїцидін
	Бревін
	Едеїн
	Есеїн
	Брессеїн
	Бревістин
<i>Bacillus subtilis</i>	Мікобацилін
	Субтілін
	Бацилізин
	Бацидоміцин
	Фунгістатин
	Бульбіформін
	Бацилін
	Субспорин
	Бацилоцин
	Мікосубтилін
	Фунгоцин
	Ітурін
	Неоцидін
	Еуміцин

продовження табл. 1

<i>Bacillus pumilus</i>	Мікрокцин Р
	Пумілін
	Тетаїн
<i>Bacillus mesentericus</i>	Есперін
<i>Bacillus thiaminolyticus</i>	Октопітин
	Бацифелацин
<i>Bacillus licheniformis</i>	Бацитрацин
	Ліхеніформін
	Протіцин
<i>Bacillus polymyxa</i>	Поліміксин
	Колістин
	Гатавалін
	Жоліпептин
<i>Bacillus circulans</i>	Бутірозин
	Циркулін
	Поліпептин
	ЕМ-49
	Ксилостатин
<i>Bacillus laterosporus</i>	Латероспорамін
	Латероспорин
<i>Bacillus cereus</i>	Біоцерин
	Церексин
	Тіюцилін

Більшість ідентифікованих антибіотиків, що продукуються бактеріями роду *Bacillus*, за хімічною природою є пептидами.

1.2. Характеристика пептидних антибіотиків

Антибіотики цієї групи широко розповсюджені в природі, вони продукуються різними видами актиноміцетів, бактерій, грибів і дуже різні за своєю хімічною будовою - настільки різноманітні, що їх хімічна класифікація стає розмитою, тобто можна виділити занадто багато різних підгруп [Edward et al., 1977]. Тому доведеться обмежитися лише аналізом найбільш типових структур, яскравих прикладів і тих структурних особливостей, які є досить загальними.

У першу чергу варто відзначити, що антибіотики цього типу обов'язково містять амінокислоти: кількість амінокислотних залишків може варіюватися від декількох одиниць (антибіотик циклосерин утворений тільки однією амінокислотою) до кількох сотень (неокар-цінонатин містить аспарагінази і 109 амінокислот, більш того: їх молекулярна маса варіюється від 30 до 130 тисяч Дальтон) [Edward et al., 1977].

У другу чергу слід звернути увагу на «якість» амінокислот, що беруть участь в утворенні пептидних антибіотиків: це можуть бути як звичайні протейногенні α -L-амінокислоти, так і непротейногенні амінокислоти, крім того – тут беруть участь α -амінокислоти D-конфігурації. А якщо врахувати різні окисислоти, що вклинюються в поліпептидні ланцюжки, то можна побачити, наскільки різноманітна «якість» субодиниць, що беруть участь в побудові молекулярних структур пептидних антибіотиків [Marahier et al., 1993].

Третій, досить загальний структурний фактор пептидних антибіотиків - це вид поліпептидного (або депсіпептидного) ланцюжка: або це відкритий класичний ланцюг, або циклополіпептидна структура, або комбінована система з циклу і відкритого ланцюжка, або система декількох невеликих циклів [Marahier et al., 1993; Edward et al., 1977].

Утворення антибіотиків відбувається зазвичай в логарифмічній фазі росту для багатьох продуцентів, однак для спороутворюючих бактерій властиві і інші терміни їх продукції.

Утворення пептидних антибіотиків у бацил контролюється азотною і вуглецевою репресією; вплив репресії на ці процеси може змінювати взаємозв'язок між характером росту культур і кількістю утворених антибіотиків [Jenssen et al., 2006].

Зниження синтезу антибіотика бацилами обумовлено не катаболітною репресією вуглецем, а зміною рН середовища, викликаною мікробним метаболізмом. Цей висновок базувався на зворотньому ефекті, який спостерігається при додаванні в живильне середовище CaCO_3 . Надалі встановлено, що пригнічення синтезу антибіотика визначається не зміною рН середовища, а утворенням з глюкози органічних кислот (оцтової і піровиноградної). Їх нейтралізація знімає інгібування синтезу антибіотиків.

Таким чином, пептидні антибіотики синтезуються бацилами-продуцентами в стадії активного росту. Розшифрування механізмів продукції антибіотиків сприяє прогресу досліджень, пов'язаних з позаклітинним синтезом пептидних антибіотиків. Позаклітинний синтез граміцидіну, тироцидіну, граміцидіну лінійного, едеїну, бацитраціну, колістіну і мікобацилліну детально висвітлено в роботах вчених в 70-х роках 20 століття [Jenssen et al., 2006].

Біосинтетичні системи бацил, в яких відбувається утворення названих вище поліпептидних антибіотиків, відрізняються від систем, в яких синтезується білок. Необхідні умови для синтезу антибіотика включають, як правило, такі компоненти: амінокислоти, аденозин-5-трифосфат, іони магнію, що редукує агент і вільну від клітин супернатант-центрифугат культуральну рідину [Marahier et al., 1993].

1.3. Класифікація пептидних антибіотиків

Існує декілька класифікацій пептидних антибіотиків, що базуються на молекулярній структурі та механізмі дії, а також на шляхах біосинтезу даної групи антимікробних метаболітів.

1.3.1. Класифікація пептидних антибіотиків за механізмом дії і хімічною будовою

В залежності від механізму дії та хімічної будови синтезовані бактеріями роду *Bacillus* антибіотики поділяються на такі класи [Marahier et al., 1993]:

- основні пептиди (наприклад, едеїн), що пригнічують утворення 30 S-рибосомних комплексів і інгібують синтез ДНК;
- циклічні олігопептиди (наприклад, бацитрацин), що пригнічують синтез клітинних стінок;
- лінійні або циклічні олігопептиди, що порушують функції мембран - граміцидін, Тироцидін В або інгібуючі синтез РНК - наприклад, тиротрицин;
- аміноглікозидні антибіотики - бутірозін.

Представниками досить простих поліпептидних антибіотиків є граміцидіни А, В, С і D (лінійні) і граміцидін S (циклічний), які продукують *Bacillus brevis*. Всі вони утворені протеїногенними амінокислотами, з тією лише особливістю, що деякі з них мають D-конфігурацію - D-Leu, D-Val, D-Phe, а у загальному балансі переважають гідрофобні амінокислоти. Їх біологічний ефект пов'язаний з порушенням йонного транспорту через мембрани бактерій: лінійні граміцидіни (А) вбудовуються у мембрану у вигляді димерної спіралі з осьовою порожниною, яка виконує роль йонного каналу; циклічні граміцидіни (S) виконують ту ж роль, але тільки за іншим механізмом - за механізмом "гість-господар", коли йон включається всередину макроцикла і в такому вигляді транспортується через мембрану клітини. Цими ж мікробами продукуються вельми близькі за структурою циклополіпептидні антибіотики туроцидіни [Bredesen et al., 2001].

Дуже різноманітні пептидні антибіотики, утворені непротеїногенними амінокислотами: як правило, це циклополіпептиди. Вони дуже різноманітні і з боку біологічної активності – від росторегулюючих (бацитрацин А), що використовується у ветеринарії, до туберкулоостатичних (туберактіноміцин, капреоміцин).

До цієї ж підгрупи поліпептидних антибіотиків відносяться поліміксини, що продукуються різними штамми *Bacillus polymyxa* і *B. circulans*.

Поліміксини – група антибіотиків, які здійснюють порушення цитоплазматичної мембрани і володіють вузьким спектром активності проти грамнегативної біоти. За хімічним складом – це складні органічні сполуки, основою яких є поліпептид. Природний продуцент: *Bacillus polymyxa* і деякі інші. Важливою біологічною особливістю поліміксинів є висока активність по відношенню до грам-негативних бактерій, особливо до *Pseudomonas aeruginosa*, що і використовується в медичній практиці. За хімічною природою це полієнові сполуки, що включають залишки поліпептидів. У звичайних дозах препарати цієї групи діють бактеріостатично, в високих концентраціях – мають бактерицидну дію [Umezawa et al., 1988].

З препаратів в основному застосовуються поліміксин В і поліміксин М. Мають виражену нефро- і нейротоксичність.

У листопаді 2015 року з'явилися повідомлення про виявлення плазміди MCR-1, що містить ген стійкості до поліміксину Е (Colistin) [Liu Y. Y. et al., 2016].

Поліміксини – група антибіотиків, що відносяться до препаратів «останнього шансу», до яких вдаються в тих випадках, коли звичайні засоби лікування вичерпані. Хоча у поліміксинів є досить важкі побічні ефекти у вигляді нефро- і нейротоксичності, вони все-таки дають хороші шанси на порятунок від вкрай небезпечної інфекції. Всесвітня Організація Охорони здоров'я відносить поліміксин до групи критично важливих антимікробних препаратів.

Резистентність до поліміксину поки залишається дуже великою рідкістю. Описано відповідні мутації в бактеріальній хромосомі, проте випадків горизонтального переносу генів цієї здатності не спостерігалось. Інакше стійкість могла б швидко поширитися, передаючись не тільки в рамках одного штаму, а й по всьому пулу бактеріальних геномів, в тому числі і між різними видами. Але, схоже, є й інший ген [Olaitan et al., 2008].

Дослідники Південно-Китайського сільськогосподарського університету (SCAU) виявили новий ген стійкості до колістин - антибіотика поліміксинової групи. MCR-1 розташований на рухомому генетичному елементі, плазміді, і здатний до горизонтального переносу. Поява MCR-1 вказує падіння останньої групи антибіотиків, поліміксинів. Хоча зараз MCR-1 обмежений Китаєм, незабаром він може повторити долю інших глобально поширених механізмів стійкості [Olaitan et al., 2008].

1.3.2. Класифікація за механізмом біосинтезу

Пептидні антибіотики представників роду *Bacillus* можна розділити на 2 підгрупи на основі механізму біосинтезу [Nakano, 1990; Marx et al., 2001]. Одна з цих підгруп включає малі мікробні пептиди, які нерибосомно синтезуються великими ферментативними комплексами, тоді як друга підгрупа включає рибосомно синтезовані пептиди [Marx et al., 2001; Li et al., 2012].

1.3.2.1. Нерибосомно синтезовані пептидні антибіотики

Пептидні антибіотики, продуковані бацилами, такі як граміцидін, тироцидін, бацитрацин, сурфактин, ітурини та фенгіцини синтезуються нерибосомно за допомогою багатоступеневого механізму, що передбачає виділення та конденсацію залишків амінокислот за допомогою мультиферментних тіотемплейтів (multienzyme thiotemplates). Цей механізм синтезу опосередкований нерибосомними пептидними синтетазами. У цьому процесі великі багатоеlementні ферменти в діапазоні від 100 до понад 1600 кДа відіграють ключову роль у синтезі цих пептидів [Stachelhaus et al., 2005]. Нерибосомно синтезовані пептиди збираються з понад трьохсот різних попередників. Ці пептиди можуть бути лінійними або циклічними, а також можуть містити циклічні розгалужені структури, що містять гідроксильну групу, l-амінокислоти або d-амінокислоти. Більше того, ці пептиди можуть бути додатково модифіковані шляхом N-метилування, ацилювання, глікозилювання або гетероциклічного утворення кільця [Hancock et al., 1999].

Граміцидін S і тироцидін – це невеликі циклічні пептиди, що продукуються штамами *Brevibacillus brevis* (раніше їх називали *Bacillus brevis*) ATCC 9999 та ATCC 8185, відповідно. Синтез граміцидіну S каталізується багатофункціональним ферментним комплексом граміцидін S синтетазою. Багатофункціональний тіошаровий механізм також бере участь у біосинтетичному шляху 12-амінокислотного пептидного антибіотика бацитрацин A, який продукується певними штамами *Bacillus licheniformis* [Nakano, 1990]. Три багатофункціональні ферменти, BA1 (335 кДа), BA2 (240 кДа) і BA3 (380 кДа), каталізують синтез бацитрацину A [Haddar et al., 2007]. Однак біосинтез пептидних антибіотиків може також відбуватися за допомогою альтернативних механізмів тіопланшетів. Наприклад, 7-амінокислотний залишковий ліпопептидний антибіотик, що містить сурфактин, виробляється деякими штамами *Bacillus subtilis*. Цей антибіотик синтезується нерибосомно; однак, його механізм синтезу, очевидно, відрізняється від механізму мультиферменту тіопласти [Nakano, 1990]. Регуляція біосинтезу сурфактину включає механізми контролю, що сприймають кворум, та контроль компонентів ферментаційного середовища, таких як глюкоза та глютамін [Nakano, 1990; Schallmey et al., 2004].

Протигрибкові ліпопептиди, такі як ітурин, бациломіцин та фенгіцин, виробляються кількома штамами *B. subtilis*. Ці амфіпатичні ліпопептиди мають молекулярну масу від 1028 до 1084 Да і синтезуються великими мультиферментними комплексами з модульно розташованими каталітичними доменами [Peuroux et al., 1999; Baindara et al., 2013]. Бацилізин, дипептид, що містить l-аланін, є одним з найпростіших пептидних антибіотиків і виробляється штамом *B. subtilis* Marburg 168. Амінокислотна лігаза (бацилізинсинтетаза) синтезує бацилізин із його попередників-амінокислот у присутності АТФ та Mg^{2+} [Nakano, 1990].

1.3.2.2. Рибосомно синтезовані пептидні антибіотики

Рибосомно синтезовані пептидні антибіотики широко поширені в природі і містять від 12 до 50 амінокислотних залишків. Вони, як правило, катіонні та мають велику структурну різноманітність [Marx et al., 2001]. Бактеріоцини – це рибосомно синтезовані антимікробні пептиди (АМП), які продукуються бактеріями і, як правило, активні щодо штамів бактерій, тісно пов'язаних із штамми-продуцентами. Ці АМП складаються з різноманітної групи амфіфільних та (або) гідрофобних АМП [Oscáriz et al., 2006]. Більше того, бактеріоцини, що продукуються *Bacillus spp.* демонструють ширший антимікробний спектр, ніж більшість молочнокислих бактеріоцинів [Wang et al., 2014]. Ці агенти включають субтилін з *B. subtilis*; коагулін від *Bacillus coagulans*; бактурицин F4, турицин 17, ентомоцин 9 та тохіцин з *Bacillus thuringiensis*; церецин 7 від *Bacillus cereus*; бацилоцин 490 від *B. licheniformis*; та інших бактеріоцинів [Aunpad et al., 2007].

Бактеріоцини класифікуються за хімічною структурою, термостабільністю, молекулярною масою, ферментативною чутливістю, наявністю модифікованих амінокислот та способом дії [Motta et al., 2008]. Вперше бактеріоцини класифікував Клаєнхеммер (1993). Він запропонував 4 класи для бактеріоцинів: лантибіотики класу I (такі як модифікована амінокислота лантіонін та малі пептиди <5 кДа), цистибіотики класу II (малі пептиди, що містять один або кілька дисульфідних зв'язків, необхідних для їх діяльності, <10 кДа, термостійкі і мембранно-активні), тіолбіотики класу III (містять активну групу –SH, вищу молекулярну масу, <30 кДа і нестійкі до нагрівання) та клас IV (складні білки, що містять один або більше ліпідів або вуглеводних компонентів) [Rea et al., 2011]. Абріуель та ін. (2011) класифікували бактеріоцини *Bacillus* на 3 категорії: клас I (посттрансляційно модифіковані пептиди), клас II (немодифіковані пептиди) та клас III (великі білки). Крім того, бактеріоцини класу I були розділені на 4 підкласи, тоді як бактеріоцини класу II були розділені на 2 підкласи. У 2011 р. Реа та його співробітники [Rea et al., 2011] також описали оновлену класифікацію

грампозитивних бактеріоцинів та бактеріоциноподібних пептидів та білків: клас I, модифіковані пептиди, що містять лантибіотики та лантипептиди, лабіринтопептини та сактибіотики; клас II, немодифіковані пептиди, що містять педіоциноподібні пептиди, 2-пептидні бактеріоцини, циркулярні бактеріоцини та лінійні непедіоциноподібні 1-пептидні бактеріоцини; і нарешті, бактеріолізени (раніше клас III), що містять небактеріоцинові літичні пептиди. Вони також розділили лантибіотики та педіоциноподібні пептиди на 4 підкласи, а сактибіотики, 2-пептидні бактеріоцини та циркулярні бактеріоцини на 2 підкласи кожен. Нещодавно Коттер та його колеги (2013) також запропонували класифікацію бактеріоцинів на основі рибосомно синтезованих бактеріоцинів. У цій класифікації клас I (модифікований) містить посттрансляційно модифіковані пептиди, включаючи лантибіотики (наприклад, мерсацидін), сактибіотики (наприклад, субтилізін A, CD-турицин), глікоцини (наприклад, субкланцин 168) тощо. З іншого боку, клас II (немодифікований або циклічний) був розділений на ще 5 підкласів.

Лантибіотики є одними з найкращих характеристик АМП. Ці невеликі мікробні пептидні антибіотики мають різноманітні незвичні залишки амінокислот, генетичні детермінанти та механізми біосинтезу. Під час дозрівання передчасні пептиди зазнають посттрансляційних модифікацій шляхом введення незвичних амінокислот тіоефіру, таких як лантіонін та метилантіон, разом з протеолітичним видаленням провідних [Rea et al., 2011]. Зрілі лантибіотики, як правило, містять один або кілька незвичних залишків дегідро, які не беруть участі в мостиках лантіоніну, і, отже, можуть бути корисними компонентами при розробці нових біомолекул [Aunpad et al., 2007]. Arias та його колеги (2013) ідентифікували амілолізін, передбачуваний лантибіотик, який був виділений із штаму *B. amyloliquefaciens* GA1. Імовірний кластер генів лантибіотиків, що містить структурний ген (am / A) та гени, відповідальні за модифікацію (am / M), транспорт (am / T), регуляцію (am / KR) та імунітет (am / FE), був ідентифікований через характеристику геному [Arias et al., 2013].

Субтилозин А, який був виділений із штаму дикого типу *B. subtilis* 168, являє собою синтезований рибосомою та посттрансляційно модифікований антимікробний пептид бактеріоцину. Його відмітна структура вказує на те, що субтилозин може належати до виняткового та унікального класу бактеріоцинів [Kawulka et al., 2003]. На відміну від більшості катіонних бактеріоцинів, націлених на мембрану, цей унікальний макроциклічний бактеріоцин має аніонну природу [Huang et al., 2009]. Субтилозин – циклічна молекула з 35 амінокислот з унікальною посттрансляційною структурою, що включає 3 сірчані поперечні зв'язки між залишками цистеїну та α -вуглецевими речовинами 2 фенілаланінів та 1 залишку треоніну [Kawulka et al., 2003; Huang et al., 2009].

Цікаво, що також виявлено винятково відмінний клас АМП від виду *Bacillus. Brevibacillus brevis* виробляє складну суміш антибіотичних пептидів, яку назвали тиротрицином. У 1944 р. вперше повідомлялося, що тиротрицин проявляє протимікробну активність, подібну до хініну, проти збудника курки *Plasmodium gallinaceum*. Тиротрицин містить 9 лінійних грамїцидінів, що продукуються рибосомою (включаючи грамїцидін D), і до 28 різних типів тироцидінів і триптоцидінів, що не виробляються рибосомами [Huang et al., 2009].

Переважає більшість добре вивчених антибіотиків спороутворюючих бактерій походять від ґрунтових мікроорганізмів. Мікробна резистентність, що стала загрозою людству у ХХІ столітті спонукає вчених усього світу шукати нові джерела виділення продуцентів антибіотиків. Одним з таких джерел є води Світового океану, мікробний потенціал яких є маловивченим і багатообіцяючим.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Місце та матеріали дослідження

Робота виконана на базі кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології та Біотехнологічного науково-навчального центру Одеського національного університету імені І.І. Мечникова у 2021 р.

Для виділення бактерій роду *Bacillus* використовували зразки донних відкладень з Чорного моря, відібрані в ході експедиції М84/2 Бременського університету на судні Meteor у березні 2011 року та передані ОНУ для мікробіологічних досліджень Ю.П. Зайцевим та Б.Г. Александровим (Інститут біології моря НАНУ).

Перелік досліджуваних штамів наведено в табл. 1.

Таблиця 2

Видова приналежність досліджуваних культур

№ п/п	Видова приналежність	Шифр	№ п/п	Видова приналежність	Шифр
1	<i>Bacillus atrophaeus</i>	200	15	<i>B. megaterium</i>	054
2	<i>Bacillus subtilis</i>	203	16	<i>B. subtilis</i>	053
3	<i>Bacillus megaterium</i>	55	17	<i>B. pumilus</i>	049
4	<i>B. subtilis</i>	219	18	<i>Bacillus licheniformis</i>	048
5	<i>B. subtilis</i>	204	19	<i>B. subtilis</i>	231
6	<i>B. megaterium</i>	051	20	<i>Paenibacillus larvae</i>	018
7	<i>B. megaterium</i>	63	21	<i>B. megaterium</i>	036
8	<i>B. subtilis</i>	212	22	<i>B. pumilus</i>	A
9	<i>B. subtilis</i>	013	23	<i>B. subtilis</i>	021
10	<i>B. subtilis</i>	1223	24	<i>Bacillus sp. (?)</i>	239
11	<i>B. subtilis</i>	B	25	<i>B. subtilis</i>	217
12	<i>Bacillus pumilus</i>	229	26	<i>B. subtilis</i>	247
13	<i>B. megaterium</i>	035	27	<i>B. subtilis</i>	1
14	<i>B. pumilus</i>	041			

Виділення та ідентифікацію бацил здійснювали стандартними бактеріологічними методами та за допомогою визначення спектру жирних кислот. Цей етап роботи було проведено співробітниками кафедри

мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ Штеніковим М.Д. та Сашук О.В. Штами були люб'язно надані ними для досліджень.

Як тест-організми використовували культури бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, та дріжджоподібних грибів *Candida albicans* ATCC 18804. Тест-штами отримані з музею культур мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України.

2.2. Визначення здатності досліджуваних культур до продукування антибіотичних речовин

Здатність до продукування антибіотиків у виділених штамів визначали на щільних середовищах Гаузе-1 і МПА, порядок приготування яких наведено нижче.

Поживне середовище Гаузе-1: вода водопровідна – 1,0 г/л; крохмаль розчинний – 20,0 г/л; нітрат калію (KNO_3) – 1,0 г/л; гідроортофосфат калію (K_2HPO_4) – 0,5 г/л; сульфат магнію ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 0,5 г/л; хлорид натрію (NaCl) – 0,5 г/л; сульфат заліза ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – сліди [http://www.rcm.kz/ru/sw]. Компоненти розчиняли у дистильованій воді, доводили рН до 7,0-7,5 та стерилізували автоклавуванням при 0,5 атм. (121 °C) – 15-20 хв.

МПА готували наступним чином: 15 г порошку МПБ (ТОВ «Фармактив», Україна) та 15 г агар-агару розчиняли в 1 л дистильованої води. Суміш кип'ятили на водяній лазні на слабкому вогні та при постійному помішуванні до повного розчинення доданих інгредієнтів, доводили рН до 6,8-7,0. Автоклаували при 1 атм (121 °C) протягом 20 хвилин.

Досліджувані штами бацил засівали у двох повторях газоном 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 бактерій роду *Bacillus* щодо *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans* перевіряли методом агарових блоків [Грязнева, 2021]. Для

цього на поверхню середовища МПА в чашках Петрі висівали газоном тест-штами *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans*. З агарових пластин середовищ МПА та Гаузе-1, попередньо засіяних досліджуваними культурами бацил, стерильним пробковим свердлом вирізали блоки діаметром 5 мм та розміщували на поверхні МПА, засіяного тест-штамами. Визначення антагоністичної активності здійснювали при температурному режимі 37 °С протягом 24 год. Для кожного штаму робили по два повтори на кожний варіант умов культивування, наприклад, по два повтори для культур антагоністів, вирощених на середовищі Гаузе-1 при температурі культивування 30 °С та 37 °С, так само для культур, вирощених на середовищі МПА (рис. 1).

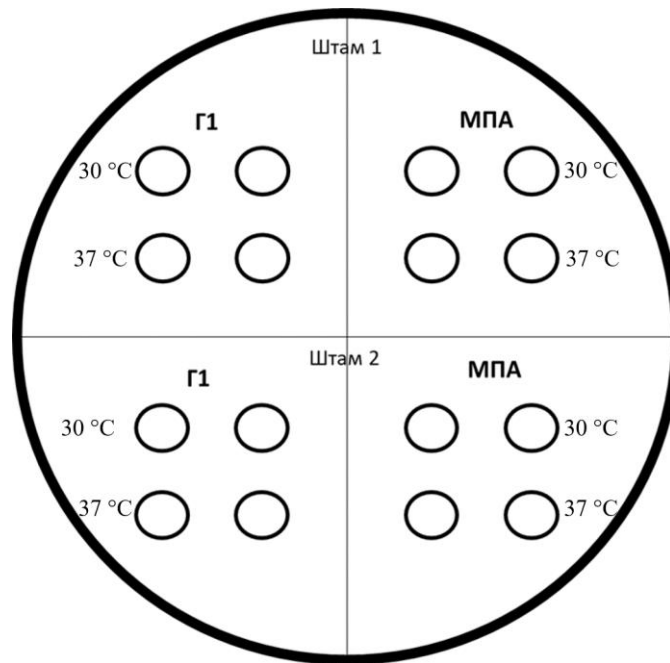


Рис. 1. Схема розташування блоків з культурами досліджуваних представників р. *Bacillus*

Оцінку антагоністичної активності представників роду *Bacillus* проводили шляхом вимірювання діаметру зони затримки росту досліджуваних штамів *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans*.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою стандартних статистичних методів, визначаючи середнє арифметичне отриманих значень та його похибку.

2.3. Технологічна схема отримання метаболітів представників роду *Bacillus* з антимікробними властивостями

На рис. 2 представлена технологічна схема оцінки антагоністичної активності досліджуваних представників р. *Bacillus* щодо *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans*. На викладеній технологічній схемі коротко описано основні кроки методики для дослідження антибіотичної активності бацил.

Першим етапом було приготування поживних середовищ МПА і Гаузе-1 для висіву на них 27 досліджуваних штамів представників роду *Bacillus*. Висів здійснювали у двох повторах газоном на поверхні обох середовищ. Проводили інкубацію при різних температурних режимах 30 ° C і 37 ° C протягом 48 год. Наступним кроком був висів газоном тест-штамів *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans* на середовище МПА. Далі з агарових пластин, які попередньо засіяні досліджуваними штамми, стерильним пробковим свердлом вирізали блоки діаметром 5 мм та розміщували на поверхні МПА, засіяного тест-штамами. Інкубація 24 години при температурі 37 °C. Далі проводили оцінку антагоністичної активності шляхом вимірювання діаметру зони затримки росту тест-штамів.

На другій стадії розробки технологічної схеми пропонується культивування штамів-продуцентів на відповідних рідких середовищах (м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) та бульйон Гаузе-1) та при температурних режимах, що забезпечують оптимальні умови для біосинтезу антимікробних речовин (рис. 2). Для цього культури продуцентів вирощують на поверхні МПА та Гаузе-1 за оптимальної для них температури протягом 24 год, готують суспензії колоній у стерильному фізіологічному розчині, доводять густину суспензії до 0,5 ОД за МакФарландом та інокують відповідні рідкі середовища. Інкують 48 год при оптимальній для кожного штаму

температурі, відокремлюють культуральну рідину від біомаси клітин та спор та екстрагують активні сполуки.

Для прогнозування можливого спектру продукованих дослідженими культурами антимікробних сполук здійснювали біоінфооматичний пошук за базами даних CAMPR₃ та NCBI. В результаті пошуку встановлено, що відомі для досліджених видів антимікробні сполуки за своєю хімічною природою належать до пептидів.

За даними літератури [Hosseini et al., 2014], для екстракції антимікробних метаболітів бацил використовують наступний метод: культуральне середовище центрифугують при 8000×g протягом 10 хвилин. Надосадову рідину фільтрують нітроцелюлозним мембранним фільтром (розмір пор: 0,22 мкм). Фільтрат змішують з 25% (об/об) органічних розчинників, таких як хлороформ, етилацетат та метанол; далі енергійно струшують і дозволяють відокремитись. Органічну фазу відокремлюють від виснаженого супернатанту і повторюють 15 разів. Органічну та водну фази концентрують при зниженому тиску вакуумним насосом при 30 °C, поки не залишиться розчинника. Потім дві фази перевіряють на антимікробну активність методом дифузії агарових дисків.

Для зниження вартості кінцевого продукту пропонуємо замінити центрифугування з наступною фільтрацією збільшенням швидкості центрифугування до 10 об/хв та подовження її тривалості до 15 хв, оскільки за даними авторів [Gallardo-Godoy et al., 2016] такий режим дозволяє успішно відокремити культуральну рідину від біомаси клітин та спор.

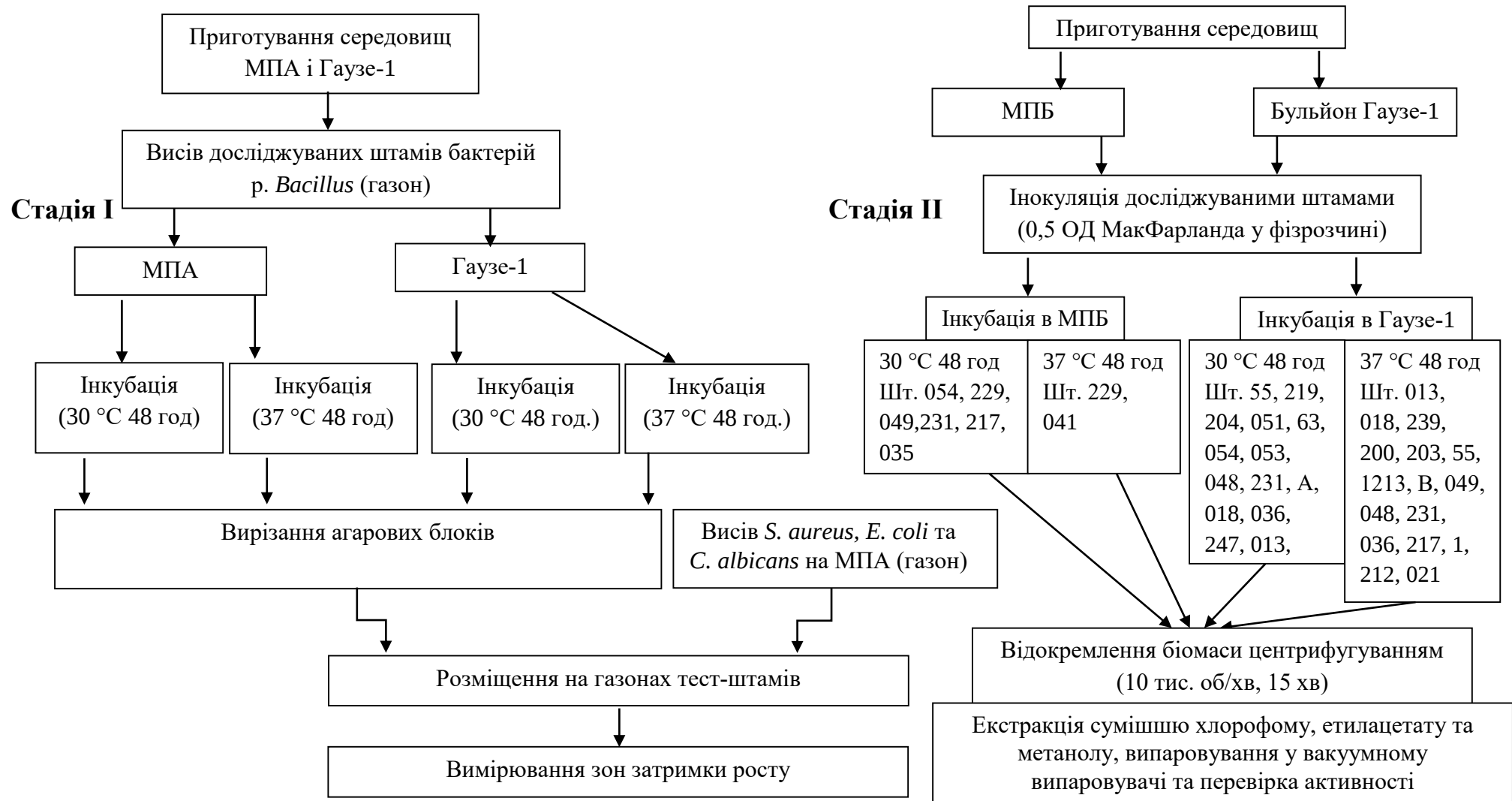


Рис. 2. Технологічна схема отримання зі спороутворюючих бактерій антибіотичних речовин, активних щодо *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans*

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Антагоністична активність досліджуваних штамів щодо

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Для визначення здатності досліджуваних культур до продукування антимікробних сполук, активних щодо грампозитивних бактерій, їх культивували при двох температурних режимах на середовищах різного складу та оцінювали здатність культур на агарових блоках до пригнічення росту тест-штаму *S. aureus* ATCC 25923. Результати експерименту наведено в табл. 3. У культур *Bacillus subtilis* 1223 та *B. subtilis* В антагоністичної активності щодо тест-штаму не виявлено.

У більшості випадків більш високі значення діаметрів зон затримки росту отримували після культивування досліджуваних штамів на середовищі Гаузе-1 (табл. 3). Також більш високій активності сприяв температурний режим 30 °С, що цілком природно з огляду на джерело виділення досліджуваних мікроорганізмів. Тим не менш, спостерігалися і виключення. Так, діаметр зони затримки росту навколо лунок з блоками *Bacillus atrophaeus* 200 на середовищі Гаузе-1, вирощених за температури 37 °С, складав 22,0±0 мм, тоді як аналогічний показник для культури, вирощеної за 30 °С, становив 17,5±2,5 мм. Для цього ж штаму спостерігали збільшення зони затримки росту навколо блока середовища МПА у порівнянні з культурою, вирощеною на Гаузе-1 за того ж температурного режиму.

Збільшення зони інгібування росту після культивування на середовищі Гаузе-1 за підвищеної температури також зареєстровано для штаму *B. subtilis* 203 (18,0 мм порівняно до 16,0 мм за 30 °С) (рис.3 (10)). Такий самий ефект спостерігали для *B. subtilis* 013, *Bacillus sp.* (?) 239 та *B. subtilis* 1 (рис.3 (8, 1, 8)).

Для культури *B. subtilis* 053 (рис.3 (6)) такий ефект зареєстровано при культивуванні на МПА. Для культур *Bacillus pumilus* 229, *B. megaterium* 035

встановлено зникнення антагоністичної активності при культивуванні за 37 °С незалежно від складу середовища (рис.1 (3)).

Таблиця 3

Антагоністична активність досліджуваних представників роду *Bacillus* щодо тест-штаму *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

№	Видова приналежність	Шифр	Умови культивування (середовище, температура)			
			Гаузе-1, 30 °С	Гаузе-1, 37 °С	МПА, 30 °С	МПА, 37 °С
1	<i>Bacillus atrophaeus</i>	200	17,5±2,5*	22,0±0	20,0±0	11,5±0,5
2	<i>Bacillus subtilis</i>	203	16,0±4	18,0±1	14,0±0	8,5±0,5
3	<i>Bacillus megaterium</i>	55	15,5±0,5	13,5±0,5	15,5±0,5	10,5±0,5
4	<i>B. subtilis</i>	219	17,0±0	16,0±2	12,0±0	11,0±2
5	<i>B. subtilis</i>	204	18,0±0	16,5±1,5	15,0±0	0
6	<i>B. megaterium</i>	051	19,5±0,5	17,0±1	16,0±0	11,5±0,5
7	<i>B. megaterium</i>	63	15,5±0,5	9,0±0	14,5±0,5	10,0±1
8	<i>B. subtilis</i>	212	22,0±0	23,0±1	14,5±0,5	14,5±1,5
9	<i>B. subtilis</i>	013	19,0±1	21,5±0,5	14,5±0,5	10,5±0,5
10	<i>B. subtilis</i>	1223	-	-	-	-
11	<i>B. subtilis</i>	B	-	-	-	-
12	<i>Bacillus pumilus</i>	229	12,5±0,5	-	14,5±0,5	-
13	<i>B. megaterium</i>	035	15,0±0	-	17,0±1	-
14	<i>B. pumilus</i>	041	15,0±0	11,5±0,5	15,5±4,5	16,5±0,5
15	<i>B. megaterium</i>	054	20,5±0,5	15,0±1	18,0±0	11,5±0,5
16	<i>B. subtilis</i>	053	20,0±0	20,0±0	10,5±1,5	17,0±3
17	<i>B. pumilus</i>	049	19,0±1	11,0±1	20,0±0	10,5±0,5
18	<i>Bacillus licheniformis</i>	048	18,5±0,5	11,5±0,5	10,0±0	14,0±3
19	<i>B. subtilis</i>	231	21,0±1	20,0±0	19,0±1	14,5±0,5
20	<i>Paenibacillus larvae</i>	018	20,0±0	20,0±0	18,0±0	12,0±0
21	<i>B. megaterium</i>	036	20,0±0	20,0±0	20,0±0	12,0±0
22	<i>B. pumilus</i>	A	21,5±1,5	15,0±0	21,0±1	14,0±0
23	<i>B. subtilis</i>	021	20,0±0	21,0±0	16,0±0	10,0±1
24	<i>Bacillus sp. (?)</i>	239	14,5±0,5	18,0±0	13,0±1	-
25	<i>B. subtilis</i>	217	19,0±1	15,5±0,5	22,0±0	9,0±0
26	<i>B. subtilis</i>	247	17,0±1	16,5±0,5	12,0±0	8,5±0,5
27	<i>B. subtilis</i>	1	18,0±0	21,5±0,5	12,0±1	10,0±0

Примітка: * – діаметр зони затримки росту, мм; «-» – активність відсутня.

Для чотирьох культур спостерігали збільшення активності при культивуванні на МПА за 30 °С у порівнянні з культурами, вирощеними на Гаузе-1 за того ж температурного режиму.

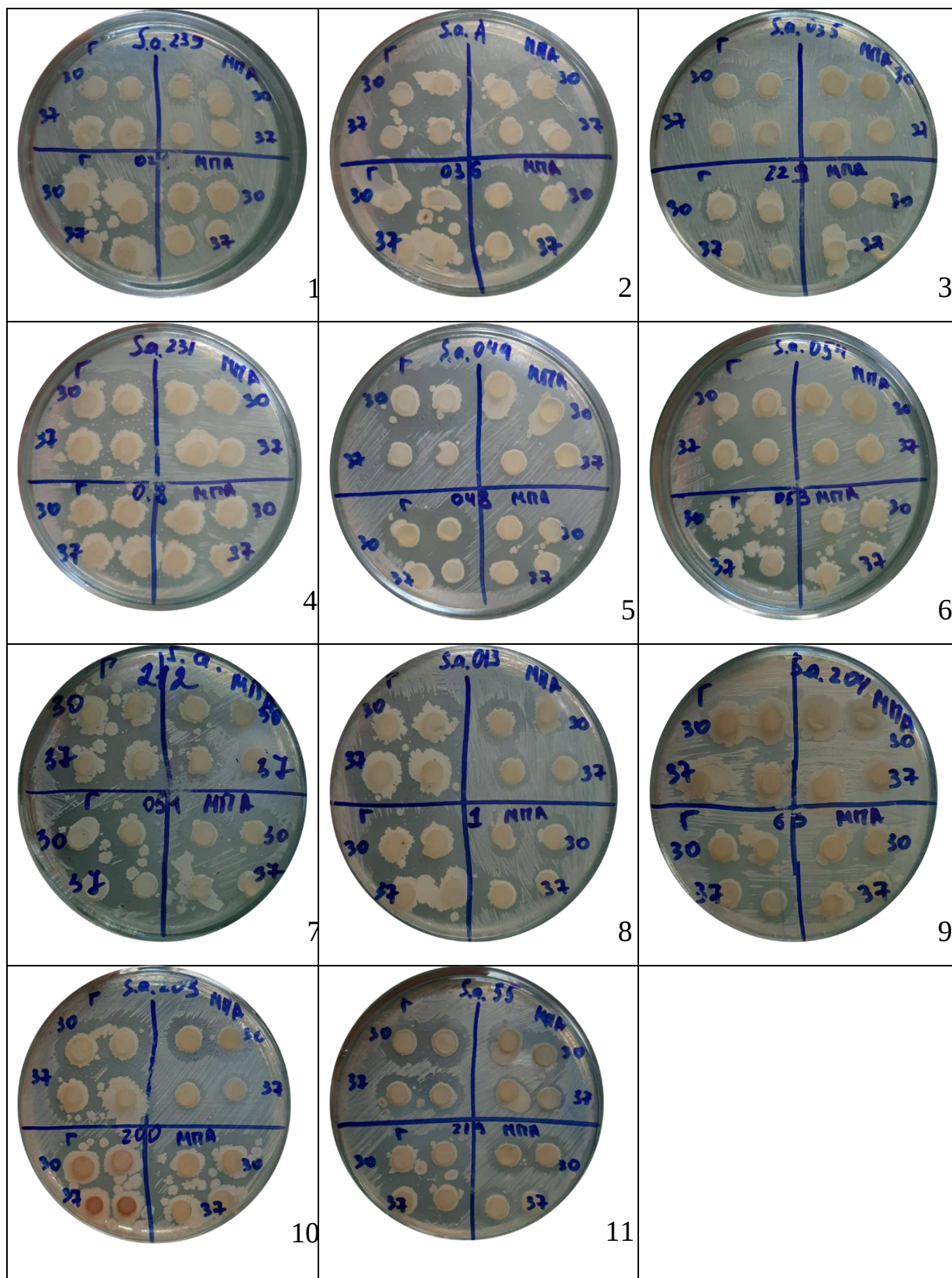


Рис. 3. Зони затримки росту культури тест-штаму *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 за впливу досліджуваних представників роду *Bacillus*

Зона затримки росту навколо блоків МПА з *Bacillus atrophaeus* 200 складала 20,0 мм, в той час як для Гаузе-1 – 17,5 мм (рис.3 (10)). Однак в цілому активність цього штаму була найвищою за культивування на Гаузе-1 за 37 °С, що у цьому варіанті досліду можна вважати оптимальними умовами для біосинтезу цим мікроорганізмом антимікробних речовин. Тим не менш, для *Bacillus pumilus* 239, *B. megaterium* 035 та *B. subtilis* 217 максимальну активність спостерігали за вирощування на МПА за 30 °С (рис.3 (1, 3, 11)).

Для *B. subtilis* 053 та *B. licheniformis* 048 показано збільшення антагоністичної активності за культивування на МПА при 37 °С у порівнянні з вирощуванням на цьому ж середовищі за 30 °С (рис.3 (6, 5)). Однак такі умови не були найоптимальнішими.

Найвищу активність щодо *S. aureus* ATCC 25923 проявила культура *B. subtilis* 212, максимальна зона затримки росту складала 23,0 мм (рис.3 (7)). Зони затримки росту від 20,0 мм також утворювалися навколо лунок з культурами *Bacillus atrophaeus* 200, *B. subtilis* 013, *B. subtilis* 231, *B. megaterium* 036, *B. pumilus* A, *B. subtilis* 021, *B. subtilis* 217, *B. subtilis* 1 (рис.3).

3.2. Антагоністична активність досліджуваних штамів щодо *Escherichia coli* ATCC 25922

При аналізі даних, отриманих після проведення експерименту по вивченню антагоністичної активності досліджуваних представників р. *Bacillus* щодо тест-штаму *E. coli* ATCC 25922 були визначені наступні особливості метаболічної активності культур (табл. 4).

Для культури *B. atrophaeus* 200 показники зони затримки росту навколо блока середовища Гаузе-1 складали $10,5 \pm 0,5$ мм і 13 ± 0 мм відповідно при культивуванні на 30 °С і 37 °С, в той час, як на середовищі МПА активності не зафіксовано. Аналогічна ситуація склалася і для штаму *B. subtilis* 203.

Таблиця 4

Антагоністична активність досліджуваних представників роду *Bacillus* щодо тест-штаму *E. coli* ATCC 25922

№	Видова приналежність	Шифр	Умови культивування (середовище, температура)			
			Гаузе-1, 30 °C	Гаузе-1, 37 °C	МПА, 30 °C	МПА, 37 °C
1	<i>Bacillus atrophaeus</i>	200	10,5±0,5	13,0±0	-	-
2	<i>Bacillus subtilis</i>	203	10,5±0,5	11,0±1	-	-
3	<i>Bacillus megaterium</i>	55	-	9,5±0,5	-	-
4	<i>B. subtilis</i>	219	10,5±0,5	10,5±0,5	-	-
5	<i>B. subtilis</i>	204	-	-	-	-
6	<i>B. megaterium</i>	051	11,5±0	11,5±0,5	-	-
7	<i>B. megaterium</i>	63	-	-	-	-
8	<i>B. subtilis</i>	212	-	-	-	-
9	<i>B. subtilis</i>	013	13,0±1	12,0±0	9,0±0	
10	<i>B. subtilis</i>	1223	8,0±1	11,0±0		
11	<i>B. subtilis</i>	B	12,0±0	12,5±0,5	7±0	7,0±0
12	<i>Bacillus pumilus</i>	229	13,5±0,5	10,5±0,5	12,5±0,5	7,0±0
13	<i>B. megaterium</i>	035	-	-	-	-
14	<i>B. pumilus</i>	041	-	-	-	-
15	<i>B. megaterium</i>	054	-	-	12,0±1	-
16	<i>B. subtilis</i>	053	-	-	-	-
17	<i>B. pumilus</i>	049	8,0±0	9,0±1	-	-
18	<i>Bacillus licheniformis</i>	048	4,5±0,5	9,0±0	-	-
19	<i>B. subtilis</i>	231	4,0±0,5	7,0±0	-	-
20	<i>Paenibacillus larvae</i>	018	13,5±0,5	13,0±1	13,0±1	9,0±0
21	<i>B. megaterium</i>	036	11,5±0,5	12,5±1,5	11,5±0,5	12,0±0
22	<i>B. pumilus</i>	A	-	-	-	-
23	<i>B. subtilis</i>	021	-	-	-	-
24	<i>Bacillus sp. (?)</i>	239	8,5±0,5	11,5±0,5	7,0±0	7,0±0
25	<i>B. subtilis</i>	217	-	10,0±1	-	-
26	<i>B. subtilis</i>	247	11,5±0,5	9,5±1,5	-	7,0±0
27	<i>B. subtilis</i>	1	13,5±0,5	15,0±0	9,0±0	9,0±0

Штам *B. megaterium* 55 проявив свою антагоністичну активність лише на поживному середовищі Гаузе-1 при температурному режимі 37 °C (діаметр зони затримки росту 9,5±0,5 мм).

Для таких культур, як *B. subtilis* 219 (рис.4 (1)) і *B. subtilis* 204 була зареєстрована антагоністична активність лише на середовищі Гаузе-1, яка не змінилась при різних температурних умовах культивування.

Збільшення зони інгібування росту після культивування на середовищі Гаузе-1 за обох температур, у порівнянні з вирощуванням на МПА, також зареєстровано для штаму *B. subtilis* 212 (13 ± 1 мм та 12 ± 0 мм відповідно). На середовищі МПА прояв антагоністичної активності спостерігали лише за культивування при температурі 30 °С.

Для *B. subtilis* 013, *B. subtilis* 053, *B. pumilus* 049, *Bacillus licheniformis* 048 показано збільшення антагоністичної активності за культивування на Гаузе-1 при 37 °С у порівнянні з вирощуванням на цьому ж середовищі за 30 °С.

Штам *B. subtilis* 1223 показує діаметр зони затримки росту навколо лунок з блоками на середовищі Гаузе-1, вирощених за температури 30 °С і 37 °С, складав 12 ± 0 мм та $12,5\pm 0,5$ мм відповідно, тоді як аналогічний показник для культури, вирощеної на МПА, становив 7 ± 0 мм (рис.4 (2)).

Культивування при температурному режимі 37° С посилювало синтез антимікробних метаболітів клітинами штаму *B. subtilis* В у порівнянні з вирощуванням при 30 °С незалежно від складу поживного середовища (рис.4 (4)).

Штам *B. subtilis* 231 показав порівняно високі результати при всіх умовах культивування ($13,5\pm 0,5$; 13 ± 1 ; 13 ± 1 мм відповідно), окрім культивування на середовищі МПА за температури 37 °С (9 ± 0 мм).

Досить високу антагоністичну активність продемонстрував штам *P. larvae* 018 при всіх умовах культивування. Біосинтетична активність культур *B. subtilis* 021, *B. subtilis* 217, *B. subtilis* 247 значно знижувалася при культивуванні на середовищі МПА. Для *Bacillus* sp. (?) 239 результати зафіксовані лише для середовища Гаузе-1 за 37 °С.

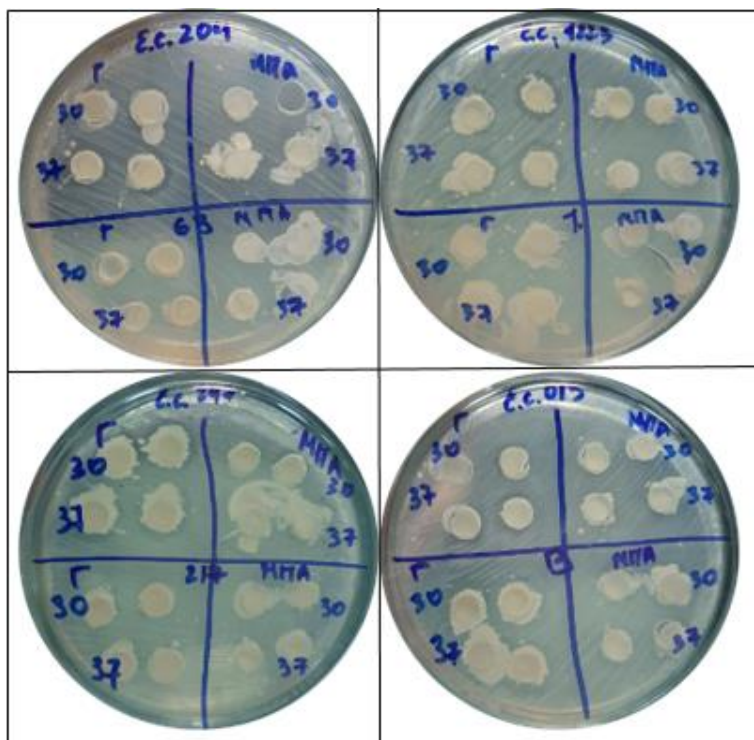


Рис. 4. Зони затримки росту культури тест-штаму *E. coli* ATCC 25922 за впливу досліджуваних представників роду *Bacillus*

Найвищу активність щодо *E. coli* ATCC 25922 проявила культура *B. subtilis* 1, максимальна зона затримки росту складала 15,0 мм (рис.4 (2)). Зони затримки росту від 13,0 мм утворювалися навколо лунок з культурами *P. larvae* 018, *Bacillus pumilus* 229, *B. subtilis* 013, *B. atrophaeus* 200, а також спостерігали зони затримки росту від 11,5 мм навколо лунок з культурами *B. megaterium* 051, *B. subtilis* B, *B. megaterium* 036, *B. megaterium* 036 та *B. subtilis* 247.

Отже, у більшості варіантів, як і у випадку визначення антагоністичної активності щодо *S. aureus*, продукування антимікробних метаболітів активніше відбувалося на середовищі Гаузе-1 за температури культивування 30 °C.

3.3. Антагоністична активність досліджуваних штамів щодо *Candida albicans* ATCC 18804

Згідно з отриманими результатами лише деякі штами *Bacillus* проявили антагоністичну активність щодо *C. albicans* ATCC 18804. Результати експерименту наведено в табл. 5.

Таблиця 5

Антагоністична активність досліджуваних представників роду *Bacillus* щодо тест-штаму *Candida albicans* ATCC 18804

№	Видова приналежність	Шифр	Умови культивування (середовище, температура)			
			Гаузе-1, 30 °C	Гаузе-1, 37 °C	МПА, 30 °C	МПА, 37 °C
1	<i>Bacillus atrophaeus</i>	200	-	-	-	-
2	<i>Bacillus subtilis</i>	203	-	-	-	-
3	<i>Bacillus megaterium</i>	55	-	-	-	-
4	<i>B. subtilis</i>	219	-	-	-	-
5	<i>B. subtilis</i>	204	-	-	-	-
6	<i>B. megaterium</i>	051	-	-	-	-
7	<i>B. megaterium</i>	63	-	-	-	-
8	<i>B. subtilis</i>	212	-	-	-	-
9	<i>B. subtilis</i>	013	7,0±0	8,0±0	7,0±0	7,0±0
10	<i>B. subtilis</i>	1223	-	-	-	-
11	<i>B. subtilis</i>	B	6,0±0	6,0±0	6,0±0	7,0±0
12	<i>Bacillus pumilus</i>	229			9,0±0	11,0±0
13	<i>B. megaterium</i>	035	-	-	-	-
14	<i>B. pumilus</i>	041	-	-	-	-
15	<i>B. megaterium</i>	054	-	-	-	-
16	<i>B. subtilis</i>	053	-	-	-	-
17	<i>B. pumilus</i>	049	-	-	-	-
18	<i>Bacillus licheniformis</i>	048	-	-	-	-
19	<i>B. subtilis</i>	231	6,0±0	6,0±0	9,5±0	6,0±0
20	<i>Paenibacillus larvae</i>	018	7,0±0	8,0±0	7,0±0	6,0±0
21	<i>B. megaterium</i>	036	-	-	-	-
22	<i>B. pumilus</i>	A	-	-	-	-
23	<i>B. subtilis</i>	021	10,5±0.5	10,0±1	8,5±0.5	6,0±0
24	<i>Bacillus sp. (?)</i>	239	-	9,5±0	-	-
25	<i>B. subtilis</i>	217	-	-	8,5±0.5	8,5±0.5
26	<i>B. subtilis</i>	247	12,0±0	12,0±0	8,0±0	7,5±0.5
27	<i>B. subtilis</i>	1	-	-	-	-

Штам *B. pumilus* 229 проявив свою активність щодо тест-штаму лише на середовищі МПА. Крім того, слід зазначити, що діаметр зони затримки росту при температурі культивування 37 °С складав 11 ± 0 , а при 30 °С він зменшився до 9 ± 0 .

Відмітимо, що діаметр зони затримки росту навколо лунок з блоками *B. subtilis* 247 на середовищі Гаузе-1, вирощених за температурами як 30 °С так і 37 °С, складав $12,0 \pm 0$ мм, тоді як аналогічний показник для культури, вирощеної на середовищі МПА, становив 8 ± 0 і $7,5 \pm 0,5$ відповідно до температурного режиму (рис.5 (3)).

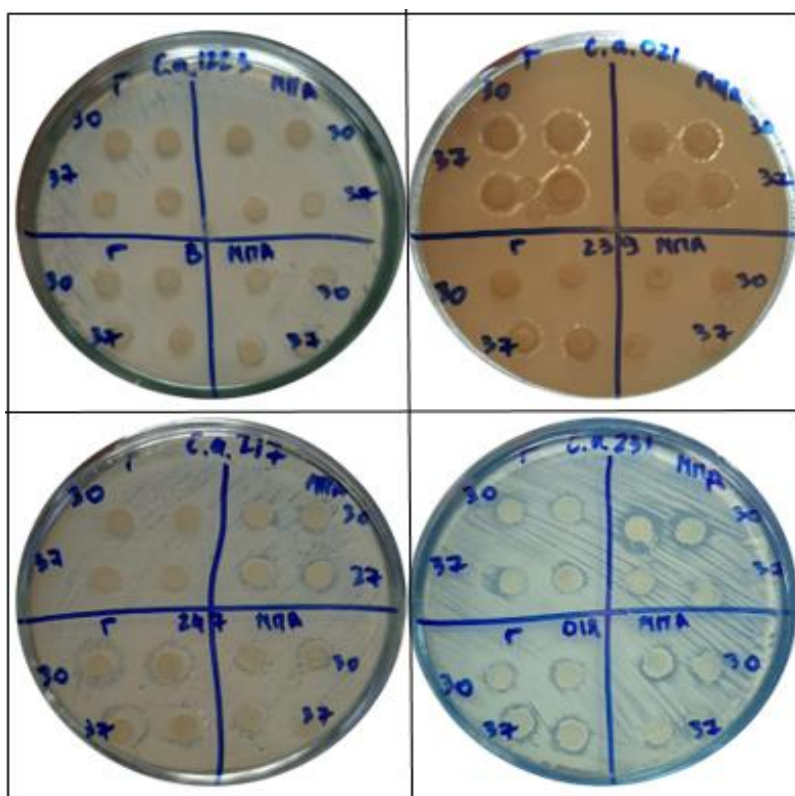


Рис. 5. Зони затримки росту культури тест-штаму *Candida albicans* ATCC 18804 за впливу досліджуваних представників роду *Bacillus*

При вивченні антагоністичної активності штаму *B. subtilis* 021 за результатами експерименту були отримані наступні дані: на поживному середовищі Гаузе-1 при температурному режимі 30 °С спостерігали діаметр зони затримки росту $10,5 \pm 0,5$, в той час як при 37 °С – $10,0 \pm 1$. Однак на

середовищі МПА показники зменшилися до $8,5 \pm 0,5$ та 6 ± 0 відповідно (рис.5 (2)).

Такі культури, як *B. subtilis* 013, *B. subtilis* В, *P. larvae* 018 проявили свою антагоністичну активність приблизно однаково, незалежно від складу поживного середовища та температурного режиму культивування.

Необхідно підкреслити, що штам *B. subtilis* 231 проявив свою активність найбільше за культивування на Гаузе-1 за 30 °С, тоді як за інших умов культивування показники зони затримки росту значно менші (рис.5 (4)).

В цілому, штами проявили різну ступінь антагоністичної активності. Для більшості культур не було зафіксовано активності, проте для дев'яти штамів була зареєстрована антагоністична активність щодо тест-штаму.

Найвищу активність щодо *C. albicans* ATCC 18804 проявила культура *B. subtilis* 247, максимальна зона затримки росту складала 12,0 мм (рис.5 (3)). Зони затримки росту від 10,0 мм також утворювалися навколо лунок з культурами *Bacillus pumilus* 229 та *B. subtilis* 021 (рис.5 (2)).

У цілому, найвищу чутливість до спектру сполук, що продукуються клітинами досліджуваних штамів, проявила культура *S. aureus* ATCC 25923, щодо якої 25 з 27 досліджуваних культур проявили антагоністичні властивості. Щодо *E. coli* ATCC 25922 активність спостерігали у 17 з 27 штамів, щодо *C. albicans* ATCC 18804 – у 9 культур з 27. При цьому оптимальними умовами для синтезу метаболітів з антибактеріальними властивостями щодо грампозитивних бактерій було культивування на середовищі Гаузе-1 за температури 30 °С.

Біосинтез метаболітів, активних щодо *E. coli* ATCC 25922, також відбувався інтенсивніше на середовищі Гаузе-1, але залежність від температури змінювалася для різних штамів. Синтез метаболітів з антифунгальними властивостями, навпаки, в деяких випадках відбувався більш активно на середовищі МПА, температурний режим у більшості варіантів не викликав значних відмінностей в активності. Так, культура *B.*

pumilus 229 активніше продукувала сполуки, що пригнічували ріст стафілокока та кандиди, при вирощуванні на МПА; активних щодо *E. coli* ATCC 25922 метаболітів після інкубації на цьому середовищі не виявлено. Такий самий ефект спостерігали для *B. subtilis* 217. Серед досліджуваних культур не виявлено антагоністу всіх тест-штамів. Очевидно, що спектр метаболітів є штамовою ознакою, їх природа та активність дуже різноманітні. Культури, активні щодо *S. aureus* ATCC 25923 можна використовувати для біосинтезу антимікробних сполук з високою антистафілококовою активністю, щодо – *E. coli* ATCC 25922 – для отримання метаболітів, активних щодо бактерій кишкової групи, щодо *C. albicans* ATCC 18804 – для продукування антифунгальних сполук.

Nastro R.A. зі співавт. [Nastro et al., 2011] показано, що зниження температури нижче 20 °C спричиняє послаблення біосинтетичної активності бацил. При цьому Khan зі співавт. відмічали, що оптимальною температурою для продукування антимікробних метаболітів деякими морськими спороутворюючими бактеріями є діапазон 25-30 °C [Khan et al., 2017]. Аналіз отриманих у роботі даних свідчить про те, що оптимальні умови для максимальної продуктивності досліджуваних культур необхідно підбирати індивідуально в залежності від штаму.

Дослідники, що вивчають здатність морських бацил до продукції антибіотиків, пропонують застосування різноманітних поживних середовищ: м'ясо-пептонний бульйон, бульйон Мюллера-Хінтона, синтетичні середовища з різними джерелами вуглецю, включаючи глюкозу, гліцерол та ін. [Li et al., 2009; Michiko et al., 2008; Nastro et al., 2011], відмічаючи, що максимальна антибіотична продуктивність на різних середовищах є штамоспецифічною ознакою та вимагає підбору їх оптимального складу у кожному конкретному випадку. Аналіз отриманих у роботі даних підтверджує цю точку зору та свідчить про необхідність подальшого детального вивчення властивостей морських спороутворюючих бактерій.

3.4. Прогнозування можливого спектру антимікробних метаболітів досліджених мікроорганізмів

Аналіз, проведений у базах даних NCBI (біологічна база даних) та CAMPR₃ (колекція антимікробних пептидів), дозволив визначити приблизний спектр антимікробних пептидів, що продукуються дослідженими штамми.

Результати пошуку представлені в табл. 6. Більшість знайдених в базах антимікробних пептидів були активними щодо грампозитивних бактерій. Для частини сполук спектр дії не вказано.

У *B. subtilis* знайдено 13 антимікробних сполук пептидної природи, з них 8 сполук, активних щодо грампозитивних бактерій. Серед досліджуваних культур 11 належали до цього виду. Цікаво, що у двох штамів не виявлено активності щодо *S. aureus*. Для *B. atrophaeus* знайдено одну антимікробну сполуку – субтилізин А, вірогідно, досліджені культури, що належать до цього виду, викликали затримку росту тест-штамів саме за рахунок продукції даного пептиду.

Метаболіти, активні у відношенні грамнегативних бактерій, виявлено у окремих штамів *B. subtilis* та *B. licheniformis*. До них належать субпептин JM4-A, субпептин JM4-B, антимікробний пептид LCI та ліхеніцидіни. Здатність до продукування сполук з такою активністю мали 8 з 11 штамів *B. subtilis*. Єдиний штам *B. licheniformis*, використаний у роботі, не проявляв вираженої антагоністичної активності щодо *E. coli*, а отже, або нездатний до синтезу цієї сполуки взагалі, або потребує подальшої оптимізації умов культивування.

Таблиця 6

**Спектр антимікробних пептидів, що продукуються спороутворюючими бактеріями досліджених видів
(за результатами пошуку у базах даних)**

Вид/штам	Назва сполуки	Біологічна активність	Спектр активності	Тип метаболіту	Характер дії
<i>B. subtilis</i>	субпептин JM4-A	Антибактеріальна	Гр+, Гр-	екзо	цитоліз
	субпептин JM4-B	Антибактеріальна	Гр+, Гр-	екзо	цитоліз
	еріцин А	Антибактеріальна	Гр+	бактеріоцин	
	еріцин S	Антибактеріальна	Гр+	бактеріоцин	
	Ентианін	Антибактеріальна	Гр+	бактеріоцин	
	лантибіотик субтілін	Антибактеріальна	Гр+	бактеріоцин	цитоліз
	субтилізін А	Антибактеріальна		бактеріоцин	
	субтилізін А – <i>Bacillus subtilis</i>	Антибактеріальна		бактеріоцин	
	субтилізін А1	Антибактеріальна	Гр+	бактеріоцин, екзо	цитоліз
шт. 168	SPBc2 профаг-похідний бактеріоцин субланцин-168	Антибактеріальна		бактеріоцин, екзо	цитоліз
	субланцин-168	Антибактеріальна	Гр+	бактеріоцин	
	антимікробний пептид LCI	Антибактеріальна	Гр-	екзо	
	субтилін	Антибактеріальна			

Продовження табл. 6

<i>B. atrophaeus</i> шт. 1942	субтилізін А	Антибактеріальна		бактеріоцин	
<i>B. megaterium</i> шт. ATCC 12872 / QMB1551	antibiotic protein, putative	Антибактеріальна		бактеріоцин	
<i>B. licheniformis</i>	ліхенін	Антибактеріальна		бактеріоцин, екзо	цитоліз
шт. DSM 13 = ATCC 14580	лантибіотик ліхеніцидін А2	Антибактеріальна	Гр ⁺	бактеріоцин, екзо	цитоліз
шт. DSM 13 / ATCC 14580	лантибіотик ліхеніцидін А1	Антибактеріальна		бактеріоцин, екзо	цитоліз
	лантибіотик ліхеніцидін VK21 А1	Антибактеріальна		бактеріоцин, екзо	цитоліз
	лантибіотик ліхеніцидін VK21 А2	Антибактеріальна		бактеріоцин, екзо	цитоліз
шт. ATCC 14580 або VK 21	ліхеніцидін	Антибактеріальна	Гр ⁺ , Гр ⁻	бактеріоцин	
шт. CG-B52	лантибіотик ліхеніцидін А2	Антибактеріальна		бактеріоцин	
шт. CG-B52	лантибіотик ліхеніцидін А1	Антибактеріальна		бактеріоцин	
<i>B. pumilus</i>	плантазоліцин	Антибактеріальна	Гр ⁺	плантазоліцин, екзо	цитоліз
шт. ATCC 7061	плантазоліцин	Антибактеріальна		плантазоліцин	

Сполук з антифунгальними властивостями у базах даних не виявлено. Отже, спектр метаболітів досліджених штамів, що проявили активність щодо *C. albicans*, потребує детального вивчення.

Для виду *Paenibacillus larvae* пошук за базами даних не дав результатів. Отже, інформацію про антимікробні сполуки з розшифрованою структурою для даного виду поки немає. Тим не менш, його висока антагоністична активність штаму *P. larvae* 018 щодо культури *S. aureus* свідчить про перспективність даного штаму як продуцента антимікробних агентів з активністю у відношенні грампозитивних бактерій. У цього штаму також виявлено слабку антифунгальну активність. Для інших видів роду *Paenibacillus* відома здатність до синтезу антимікробних пептидів [Grady, 2016]. Отже, запропонована схема їх отримання може бути застосована і у випадку штаму *P. larvae* 018.

ВИСНОВКИ

1. 25 з 27 досліджуваних культур проявили антагоністичні властивості щодо *S. aureus* ATCC 25923. Діаметри зон затримки росту найбільш активних культур (12 штамів) перевищували 20 мм, що свідчить про їх високу біосинтетичну активність.

2. Щодо *E. coli* ATCC 25922 активність спостерігали у 17 з 27 штамів, щодо *C. albicans* ATCC 18804 – у 9 культур. Максимальний розмір зони пригнічення росту *E. coli* (15,0 мм) спостерігали за дії метаболітів штаму *B. subtilis* 1, для *C. albicans* (12,0 мм) – за дії метаболітів *B. subtilis* 247.

3. Оптимальними умовами для синтезу метаболітів з антибактеріальними властивостями щодо грампозитивних бактерій було культивування на середовищі Гаузе-1 за температури 30 °С. Біосинтез метаболітів, активних щодо *E. coli* ATCC 25922, також відбувався інтенсивніше на середовищі Гаузе-1, але залежність від температури змінювалася для різних штамів. Синтез метаболітів з антифунгальними властивостями у деяких випадках відбувався більш активно на середовищі МПА, температурний режим у більшості варіантів не викликав значних відмінностей в активності.

4. За результатами пошуку у базах даних CAMPR₃ та NCBI у представників видів спороутворюючих бактерій, до яких належали досліджені мікроорганізми, виявлено 22 антимікробні сполуки: з них 12 продукуються *B. subtilis*, 6 сполук – *B. licheniformis*, по одній сполуці – *B. atrophaeus*, *B. megaterium* та одна – *B. pumilus*. Для виду *P. larvae*, до якого належить одна з досліджених культур, дані про продукцію антибіотичних сполук у базах відсутні, однак культура проявила високу активність щодо *S. aureus* ATCC 25923, помірну – щодо *E. coli* ATCC 25922 та слабку – щодо *C. albicans*, що свідчить про здатність представників виду до біосинтезу антибіотичних сполук.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Албертс Б. Молекулярная биология клетки: в 3-х т. / Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис. – М: Мир, 1994. – 540 с.
2. Антибиотики-полипептиды (структура, функция, биосинтез) / Н.С. Егоров, А.Б. Силаев, Г.С. Катруха и др.; под ред. Н. С. Егорова. – Изд. 1-е // М: Медицина, 1987. – 189 с.
3. Бакулина Л.Ф. Перспективы применение пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus* / Л.Ф. Бакулина, И.В. Тимофеев, Н.Г. Перминова, А.Ф., Полушкина, Н.И. Печоркина // Биотехнология. – 2001. – Вип. 2. – С. 48-56.
4. Грязнева Т.Н. Биологически активные вещества, продуцируемые бактериями рода *Bacillus* / Т.Н. Грязнева // Пробиотики для животных. – Електр. Дан. – Режим доступу: <http://probiotic-plus.ru/blog/biologicheski-aktivnyie-veshhestva-produtsiruemyie-bakteriyami-roda-bacillus> (дата звернення: 06.04.2021). – Загол. з екрана.
5. Забокрицкий А. Н. Биоспорин – пробиотик, перспективный для решения актуальных задач медицины в современных условиях / А. Н. Забокрицкий, И. А. Морозов, И. А. Поберий // Медицина. – 2007. – №2. – С. 46-47
6. Забокрицкий Н.А. Біологічно активні речовини, що синтезуються пробіотичними мікроорганізмами родів *Bacillus* і *Lactobacillus* / Н.А. Забокрицкий // Здоров'я та освіта. – 2015. Вип. 3. – С. 80-89.
7. Няникова Г. Г. *Bacillus mucilaginosus*: перспективы использования / Г. Г. Няникова, Е. Я. Виноградов. – СПб.: НИИХ СПбГУ, 2000. – 124 с.
8. Сидорова Т.М. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов / Т.М. Сидорова, А.М. Асатурова, А.И. Хомяк // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53, №1. – С. 29-37.

9. Смирнов В. В. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ / В. В. Смирнов, С. Р. Резник, И. А. Василевская. – Киев : Наукова думка, 1982. – 279 с.
10. Теміров Ю. В. Біологічно активні вторинні метаболіти-пептиди, утворених термофільними штамами бацил: дис. канд. біологічних наук: 6.040102. Пушино, 2004. – 143 с.
11. Федорова О. В. Пробиотические препараты на основе микроорганизмов рода *Bacillus* / О. В. Федорова, А. И. Назмієва, Е. И. Нуретдінова, Р. Т. Валєєва // Вестник технологического университета Таджикистана. – 2016. – №15. – С. 170-174.
12. Aunpad R. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4 / R. Aunpad, K. Na-Bangchang // Curr. Microbiol. – 2007. – Vol. 55(4): 308–313.
13. Baindara P. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample / P. Baindara, S.M. Mandal, N. Chawla, P.K. Singh., A.K. Pinnaka, S. Korpole // AMB Express. – 2013. – Vol. 3(1). – P. 98-104.
14. Bizani D. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus* / D. Bizani, A.S. Motta, J.A. Morrissy, R.M. Terra, A.A. Souto, A. Brandeii // Int. Microbiol. – 2005. – Vol. 8(2). – P. 125–131.
15. Bredesen J. E. Starting point and direction of biosynthesis of gramicidin S. / J. E. Bredesen, T. L. Zimmer, S. G. Laland // FEBS Lett. – 2011. – Vol. 3. – P. 169-172.
16. Brogden N.K. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? / N.K. Brogden, K.A. Brogden // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2011. – Vol. 38(3). – P. 217–225.

- 17.CAMP_{R3} (Collection of Anti-Microbial Peptides) – База даних. Режим доступу: [CAMP \(Collection of Anti-Microbial Peptides\) \(bicnirrh.res.in\)](http://bicnirrh.res.in).
- 18.Edward K. The Peptide Antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, Biogenesis, and Possible Functions / K. Edward, A. I. Demain // Bacteriological Reviews. – 1977. – Vol. 2. – P. 449-474.
- 19.Gallardo-Godoy A. Activity and Predicted Nephrotoxicity of Synthetic Antibiotics Based on Polymyxin B / A. Gallardo-Godoy, C. Muldoon, B. Becker, A.G. Elliott, L.H. Lash, J. Huang, M. Butler, R. Pelingon, A. Kavanagh, S. Ramu, W. Phetsang, M. Blaskovich, M. Cooper // Journal of Medicinal Chemistry. – 2016. – Vol. 59 (3). – P. 1068-1077.
- 20.Grady E. N. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus* / E. N. Grady, J. MacDonald, L. Liu, A. Richman, Z.-Ch. Yuan // Microbial Cell Factories. – 2016 – Vol. 203. – P. 88-90.
- 21.Hancock R.E.W. Peptide antibiotics / R.E.W. Hancock, D.S. Chapple // Antimicrob. Agents Chemother. – 1999. – Vol. 43(6). – P. 1317–1323. – Режим доступу: <http://aac.asm.org/content/43/6/1317.short>.
- 22.Harbour P. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45 / P. Harbour, H. Leifert, L.S. Chidburee, S. Hampson, S. Workman, D. Sigee, E. Agnes // Journal of Applied Bacteriology. – 1995. – Vol. 2. – P. 97-108.
- 23.Jenssen H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R.E. Hancock // Clin. Microbiol. ReVol. –2006. – Vol. 19(3). – P. 491–511.
- 24.Katz E. The Peptide Antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, Biogenesis, and Possible Functions / E. Katz, A. Arnold, I. Demain // Bacteriological Reviews. – 1977. – Vol. 2. – P. 449-474.
- 25.Kawulka K. Structure of Subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to α -carbons of phenylalanine and threonine / K. Kawulka, T. Sprules,

- R.T. McKay, P. Mercier, C.M. Diaper, P. Zuber, J.C.Vederas // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – Vol. 125(16). – P.4726–4727.
- 26.Khan M. N. Identification and growth optimization of a Marine *Bacillus* DK1-SA11 having potential of producing broad spectrum antimicrobial compounds / M. N. Khan, H. Lin , M. Li , J. Wang, Z. A. Mirani // Pak. J. Pharm. Sci. – 2017. – Vol. 30, №. 3. – P. 839-853.
- 27.Kunst F. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* / F. Kunst, N. Ogasawara, A. Danchin // Nature. – 1997. – Vol. 390. – P. 249-256.
- 28.Leifert C. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45 / C. Leifert, H. Li Siripun Chidburee, S. Hampson, S. Workman, D. Sigee // Journal of Applied Bacteriology. – 1995. – Vol. 2. – P. 97-108.
- 29.Li J. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29 / J. Li, Q. Yang, L.H. Zhao, S. M. Zhang, Y.X. Wang, X.Y. Zhao // J. Zhejiang UniVol. Sci. B. – 2009. – Vol. 10(4). – P. 264–272.
- 30.Marahier M. A. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus* / M. A. Marahier M. M. Nakano P. Zuber // Molecular Microbiology. – 1993. – Vol. 5. – P. 631-636.
- 31.Marx R. Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by ¹H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / R. Marx, T. Stein, K.D. Entian, S.J. Glaser // J. Protein Chem. – 2001. – Vol. 20(6). – P. 501–506.
- 32.Michiko M. Molecular Biology of Antibiotic Production in *Bacillus* / Michiko M. Nakano, P. Zuber // Molecular Microbiology. – 2008. – Vol. 3. – C. 223-240.

33. Nakano M.M. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus* / M. M. Nakano, P. Zuber // Crit. Revol. Biotechnol. – 1990. – Vol. 10(3). – P. 223–240.
34. Nastro R.A. Influence of temperature on the production of antibiotic molecules in *Bacillus amyloliquefaciens* strain HNA3 / Nastro R.A., A. Di Costanzo, R. Gesuele, M. Trufuoggi, M. Inglese, M. Guida. In: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. – Ed. by. A. Mendez-Vilas, 2011. – P. 1370-1310.
35. NCBI Taxonomy – База данных. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>.
36. Ogasawara N. The systematic sequencing of the *Bacillus subtilis* genome in Japan / N. Ogasawara, H. Yoshikawa // Microbiology. – 1996. – Vol. 142. – P. 2993-2994.
37. Olaitan A. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria / A. Olaitan, S. Morand, J. Rolain // Frontiers in microbiology. – 2014. – Vol. 5. – P. 1-18.
38. Peypoux F. Recent trends in the biochemistry of surfactin / F. Peypoux, J.M. Bonmatin, J. Wallach // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1990. – Vol. 51(5). – P. 553–563.
39. Rotem S. Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties / S. Rotem, A. Mor // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – Vol. 1788(8). – P. 1582–1592.
40. Sang Y. and Blecha F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics / Y. Sang, F. Blecha // Anim. Health Res. Revol. – 2012. – Vol. 9(2). – P. 227–235.
41. Stachelhaus T. Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis / Sang Y., F. Blecha // FEMS Microbiol. Lett. – 2011. – Vol. 125(1). – P. 3–14.

42. Xing F. Characterization of a gene regulating antibiotic production in *Bacillus subtilis* BSD-2 / F. Xing, H. Cheng, S. Yin, G. Zhang, Y. Xi, L. An, L. Zhang // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2018. – Vol. 2. – P. 332-338.
43. Liu Y. Y. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study / Liu Y. Y., B.S. Yang Wang, T. R. Walsh, L.-X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Tian, B. Dong, X. Huang, L.-F. Yu, D. Gu, H. Ren, X. Chen, L. Lv, D. He, H. Zhou, Z. Liang, J.-H. Liu, J. Shen // *The Lancet*. – 2015. – Vol. 2. – P. 161-168.