

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

Д и п л о м н а р о б о т а

на здобуття ступеня вищої освіти бакалавр

на тему «Синтез сидерофорів бактеріями, ізольованими з мідій

Чорного моря»

«Synthesis of siderophores by bacteria isolated from Black Sea mussels»

Виконав: студент денної форми
навчання

спеціальність

162 Біотехнології та біоінженерія

Мартиненко Сергій Андрійович

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор

Філіпова Тетяна Олегівна

Рецензент:

кандидат біологічних наук, доцент

Паузер Олена Борисівна

Рекомендовано до захисту:

Протокол засідання кафедри

№ _____ від «___» _____ 2023 р.

Завідувач кафедри

(підпис)

Філіпова Т.О.

(прізвище та ініціали)

Захищено на засіданні ЕК № 2

Протокол №__ від «__» _____ 2023 р.

Оцінка _____ / _____ / _____

(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Голова ЕК

(підпис)

Ямборко Г.В.

(прізвище та ініціали)

Одеса – 2023

Анотація

Дипломна робота була виконана у Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Розроблено базову технологічну схему виробництва сидерофорів морськими бактеріями. Встановлено, що у монокультурах штами *Pseudomonas* синтезують у 1,7-3,1 рази більше сидерофорів ніж штами *Bacillus*. Показано, що вміст сидерофорів у ко-культурах є більшим у порівнянні з монокультурами. Найбільш ефективними виявилися консорціуми (*B. subtilis* MC3 + *P. aeruginosa* M1) та (*B. subtilis* MC3 + *P. aeruginosa* M4). Встановлено, що реальний вміст сидерофорів у ко-культурах значно перевищує розрахунковий: на 40-100%.

Дипломну роботу викладено на 46 сторінках, вона містить 4 таблиці та 7 рисунків. Наведено посилання на 46 джерел літератури.

Ключові слова: сидерофори, морські бактерії, *Pseudomonas*, *Bacillus*, ко-культивування

The thesis was completed at the Biotechnological Scientific and Educational Center of the Odessa National University named after I. I. Mechnikov.

A basic technological scheme for the production of siderophores by marine bacteria has been developed. It was established that in monocultures *Pseudomonas* strains synthesize 1.7-3.1 times more siderophores than *Bacillus* strains. It is shown that the content of siderophores in co-cultures is higher compared to monocultures. The consortia (*B. subtilis* MC3 + *P. aeruginosa* M1) and (*B. subtilis* MC3 + *P. aeruginosa* M4) were the most effective. It was established that the actual content of siderophores in co-cultures significantly exceeds the estimated content: by 40-100%.

The thesis is presented on 46 pages, it contains 4 tables and 7 figures. References to 46 sources of literature are given.

Key words: siderophores, marine bacteria, *Pseudomonas*, *Bacillus*, co-cultivation

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	4
1.ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Сидерофори та їх властивості	7
1.2. Типи морських сидерофорів та їх продуценти	9
1.2.1. Гідроксаматний тип	11
1.2.2. Катехолатний тип	13
1.2.3. Гідроксикарбоксилатний тип	14
1.2.4. Змішані типи. Гідроксамати/гідроксикарбоксилати	15
1.2.5. Змішані типи. Гідроксикарбоксилати/ катехолати	16
1.2.6. Змішані типи. Гідроксамати/катехолати	17
1.2.7. Інші типи сидерофорів	18
1.3. Біосинтез морських сидерофорів та їх транспортна функція	19
1.4. Використання морських сидерофорів	21
1.4.1. Очищення морських водойм	21
1.4.2. Інші сфери використання	23
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	25
2.1. Штами морських бактерій та умови їх культивування	25
2.2. Визначення вмісту сидерофорів	27
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	29
3.1. Технологічна схема одержання сидерофорів морських бактерій ...	29
3.2. Синтез сидерофорів у моно- та ко-культурах бактерій родів <i>Bacillus</i> та <i>Pseudomonas</i> , виділених з мідій Чорного моря	31
УЗАГАЛЬНЕННЯ	38
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	42

ВСТУП

Залізо є важливим елементом для росту майже усіх мікроорганізмів, оскільки віно діє як каталізатор в ферментативних процесах, метаболізмі кисню, приймає участь у перенесенні електронів, а також синтезі ДНК і РНК [Aguado-Santacruz et al., 2012]. Воно також необхідне для утворення біоплівки, основної форми існування мікроорганізмів в природі, оскільки регулює поверхневу рухливість і стабілізує полісахаридний матрикс [Chhibber et al., 2013]. В умовах дефіциту заліза гідрофобність поверхні мікробів зменшується, що змінює поверхневого білкового складу і призводить до обмеження формування біоплівки [Simões et al., 2007].

У зв'язку з невисокою концентрацією та нерозчинною формою заліза в оточуючому середовищі воно має низьку біодоступність. Тому мікроорганізми виробили стратегії поглинання заліза, які базуються на використанні специфічних лігандів які носять назву сидерофори [Rue et al., 1997; Macrellis et al., 2001].

Сидерофори (грец. «носій заліза») – це невеликі, високоафінні залізо-хелатуючі сполуки, які виділяються мікроорганізмами, такими, як бактерії та гриби. Вони допомагають організму накопичувати залізо [Hider et al., 2010; Saha et al., 2016]. Сидерофори є одними з найсильніших (з найвищою спорідненістю) Fe^{3+} зв'язуючих агентів. Однак спектр функцій сидерофорів є набагато ширшим [Johnstone et al., 2015].

У відповідь на обмежений вміст заліза у середовищі, гени, які беруть участь у виробництві і поглинанні сидерофорів мікроорганізмами, дерепресуються, що призводить до виробництва сидерофорів і відповідних білків поглинання. У бактеріях Fe^{2+} -залежні репресори зв'язуються з ДНК перед генами, які беруть участь у виробництві сидерофорів при високих внутрішньоклітинних концентраціях заліза. При низьких концентраціях Fe^{2+} дисоціює від репресора, який, у свою чергу, відокремлюється від ДНК, що призводить до транскрипції генів. У грамнегативних і багатих на АТ-пари

грампозитивних бактерій це зазвичай регулюється репресором Fur (регулятор поглинання заліза), тоді як у багатих на GC-пари грампозитивних бактерій (наприклад, *Actinobacteria*) це DtxR (репресор дифтерійного токсину). Тому ця система також бере участь у регуляції виробництва небезпечного дифтерійного токсину *Corynebacterium diphtheriae* [Miethke et al., 2007].

Після цього сидерофор екскретується у позаклітинне середовище, де він зв'язує та розчиняє залізо. Потім сидерофори розпізнаються специфічними клітинними рецепторами на зовнішній мембрані клітини і весь комплекс Fe-сидерофор активно транспортується усередину [Krewulak et al., 2008; Hider et al., 2010].

Сидерофори мають значний потенціал практичного використання у медицині [Абатуров та ін., 2018; Roosenberg et al., 2000], агротехнологіях [Kraemer et al., 2006], біоремедіації [Hider et al., 2010] та інших галузях.

Широке практичне використання сидерофорів неможливе без наявності високоефективних продуцентів цих сполук. Враховуючи, що морське середовище містить дуже низькі концентрації заліза (від 1 нМ до 1 мкМ) у порівнянні з ґрунтами та прісними водоймами, саме морські мікроорганізми мають синтезувати більш високі кількості сидерофорів.

У зв'язку з вищенаведеним, метою роботи було розроблення біотехнології одержання сидерофорів морських бактерій Чорного моря.

Для досягнення цієї мета було необхідним вирішити наступні завдання:

1. Розробити технологічну схему одержання сидерофорів морських бактерій.
2. Дослідити синтез сидерофорів монокультурами бактерій родів *Bacillus* та *Pseudomonas*, виділених з мідій Чорного моря.
3. Дослідити синтез сидерофорів ко-культурами бактерій родів *Bacillus* та *Pseudomonas*, виділених з мідій Чорного моря.

Об'єкт дослідження – біотехнологія одержання сидерофорів морських мікроорганізмів.

Предмет дослідження – синтез сидерофорів моно- та ко-культурами ізолюваних з поверхні мідій Одеської затоки Чорного моря бактерій родів *Bacillus* та *Pseudomonas*.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сидерофори та їх властивості

Сидерофори морських бактерій представляють собою низькомолекулярні речовини (200-2000 Da) здатні хелатувати йони заліза з водного середовища та транспортувати його в середину клітини. Вивчення морських сидерофорів почалось зовсім недавно, тому, на відміну від сидерофорів наземних організмів, їх кількість досить невисока, тих що вже дослідили, відкрили хімічну структуру. Виділений до середовища сидерофор утворює комплекс з іонами Fe^{3+} . Як правило, одна молекула сидерофору надає шість електронодонорних атомів, необхідних для комплексоутворення, оскільки іони Fe^{3+} мають координаційне число 6:



Стосовно загальної афінності сидерофорів до металів, а це є однією з їх найважливіших характеристик, є багато розбіжностей. Майже у всіх сидерофорів спорідненість до іону Fe^{3+} є абсолютною та найбільш сильною. Також проявляється афінність до іонів Fe^{2+} , проте зв'язок між ними є набагато слабшим. Але сидерофори здатні також взаємодіяти з іншими металами, наприклад іонами цинку, титану, хрому, галію. Тепер сприймаючи всі ці факти можна зробити висновок, що сидерофори можуть добре виконувати свою непряму функцію, транспортуючи інші метали до клітини, але в реальних обставинах це відбувається рідко, тому що до клітини ці метали поступають іншим чином через спеціалізовані системи транспорту та й потрібна концентрація цих елементів для бактерії в рази менша, аніж заліза, а значить синтезувати досить складні за структурою сидерофори для отримання тільки металів, що не є важливими в великій кількості бактеріям

не вигідно. Проте ці різноманітні властивості у афінності сидерофорів відкривають широкі перспективи у їх використанні для потреб людства.

Та окрім загальної специфічності сидерофорів до металів існує також відносна, адже кожен сидерофор має власну унікальну хімічну структуру, яка детермінує його здатність до взаємодії з металом, формуючи комплексну сполуку. Сам сидерофор представляє собою органічний ліганд, який в своєму складі містить залишки різних функціональних класів органічних сполук, ці сполуки містять гідроксильні групи за допомогою яких буде відбуватись приєднання заліза. При чому сам ліганд – сидерофор без металу, не є жорсткою структурою із чітко визначеною конформацією, його частини здатні обертатися в просторі, змінюючи своє положення, та коли відбувається утворення комплексу, структура стає стабільною і здатною до транспортування металу [Hider et al., 2010].

Але це ще не всі обставини, які впливають на афінність сидерофорів до металів. Окрім описаної загальної та відносної специфічності здатність утворювати комплекс також залежить від рівня рН середовища.

В 2012 році велись дослідження над *Auereobasidium pullulans* стосовно залежності утворення комплексу з залізом його сидерофорів гідроксаматного типу. Хоча цей організм є грибом, його сидерофори діють так як і деякі сидерофори морських бактерій. В досліді використовували ізолят організму та розчин FeCl_3 в якому періодично змінювали рівень рН. В кінці досліді електрофореграма показала, що висока продукція сидерофору та його специфічність зв'язування з залізом має вищий рівень тільки в певних межах значення рН і це від 4 до 9, що відповідає межах середовища існування організму. В цих межах рН сидерофор зв'язується з металом за допомогою гексадентантного зв'язку, тобто до іону феруму приєднуються шість зв'язків, що дає найвищу спорідненість комплексу та його стабільність. При виході за межі кількість зв'язків падає, тому падає і афінність [Mahendhran et al., 2012].

Рівень кислотності морської води оцінюють як слабо-лужне середовище з рН 7,5-8,5. Через велику кількість солей морська вода має буферні властивості, за наявності бікарбонатів рН стабільний, тому йони заліза перебувають тільки в певній формі, не здатній до мимовільного хімічного перетворення в іншу форму. Еволюційно склалось так, що сидерофори морських бактерій добре виконують свою функцію саме при такому рівні рН.

1.2. Типи морських сидерофорів та їх продуценти

Загалом морські сидерофори відносяться до тих же типів, що й наземні, проте можливо деякі типи ще не відкриті. Сидерофори класифікуються на основі хімічних функціональних груп, які вони використовують для хелатування заліза. Вони поділяються на 3 основних класи по переважанню певних хімічних груп, які забезпечують формування комплексів з залізом: катехолати (+ феноляти), гідроксамати та карбоксилати (рис. 1).

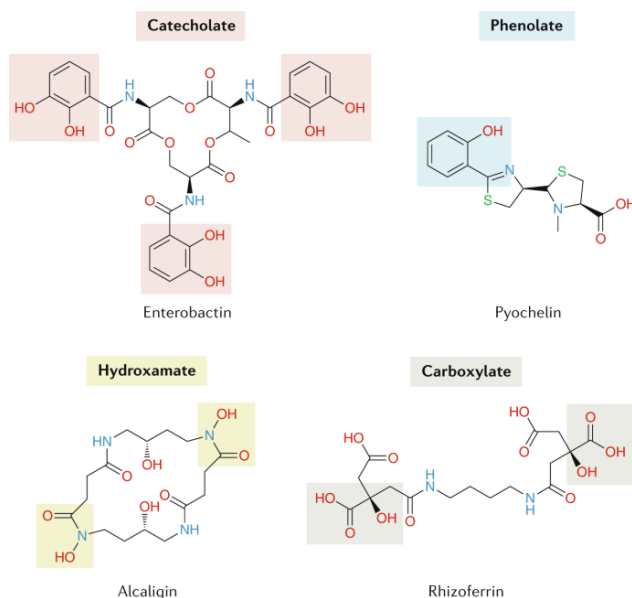


Рис. 1. Основні класи сидерофорів [Kramer, et al., 2020]

На даний час виділено біля 100 сидерофорів, що продукуються морськими бактеріями. Деякі з них та їх продуценти наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Сидерофори морських бактерій

Назва	Продуцент	Джерела
Гідроксаматний клас		
Марінобактини	<i>Marinobacter sp.</i>	[Kem, et al., 2015]
Амфібактин	<i>Vibrio sp.</i>	[Leventhal, et al., 2018]
Алкалігін, авароферрин	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Alcaligenes eutrophus</i>	[Chen, et al., 2019]
Фрадіамін	<i>Streptomyces fradiae</i>	[Chen, et al., 2019]
Альбіспоракхелін	<i>Amycolatopsis albispora</i>	[Chen, et al., 2019]
Бісукаберин	<i>Alteromonas haloplanktis</i> <i>Tenacibaculum mesophilum</i>	[Chen, et al., 2019]
Талассозамід	<i>Thalassospira profundismaris</i>	[Chen, et al., 2019]
Десферріоксаміни	<i>Salinispora tropica</i>	[Jones, et al., 2017]
Катехолатний клас		
Нігрибактин	<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	[Nielsen, et al., 2012]
Ванхробактин	<i>Vibrio anguillarum</i>	[Soengas, et al., 2006]
Трибенартин, стрептобактин, дибенартин	<i>Streptomyces sp.</i>	[Chen, et al., 2019]
Турнербактин	<i>Teredinibacter turnerae</i>	[Chen, et al., 2019]
Триванхробактин, диванхробактин	<i>Vibrio sp.</i>	[Chen, et al., 2019]
Анахелін	<i>Synechococcus sp.</i>	[Årstøl, et al., 2019]
Гідроксикарбоксилатний клас		
Вібріоферрин	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	[Amin, et al., 2009]
Гідрокарбоксилат/гідроксаматний клас		
Лоїлхихеліни	<i>Holomonas sp.</i>	[Homann et al., 2009]
Імакобактин	<i>Variovorax sp.</i>	[Chen, et al., 2019]
Аеробактин	<i>Vibrio sp.</i>	[Amin, et al., 2009]
Шизокінен	<i>Prochlorococcus sp.</i>	[Khan, et al., 2017; Årstøl, et al., 2019]
Синехобактини	<i>Synechococcus sp.</i>	[Årstøl, et al., 2019]
Гідроксикарбоксилат/катехолатний клас		
Петробактин, петробактин сульфонат	<i>Marinobacter carbonoclasticus</i> , <i>Marinobacter aquaeolei</i>	[Homann, et al., 2009]

Продовження табл. 1		
Альтеробактини	<i>Alteromonas luteoviolacea</i>	[Kano, et al., 2003]
Псевдоальтеробактини	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	[Kano, et al., 2003; Butler, 2005]
Катехолат/гідроксаматний клас		
Лістабактини	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	[Chen, et al., 2019]
Ангібактин	<i>Vibrio anguillarum</i>	[Lee, et al., 2018]
Інші класи		
Пісцибактин	<i>Photobacterium piscicida</i> , <i>Vibrio anguillarum</i>	[Balado, et al., 2018]
Тетраазолміцин	<i>Streptomyces olivaceus</i>	[Chen, et al., 2019]

Через те, що модифікації хімічної структури відбувалися на протязі тривалого періоду часу, виникло багато змішаних класів: це сидерофори які містять одночасно залишки гідроксамової кислоти та катехолів, катехолів та гідроксикарбонових кислот, гідроксамату та гідроксикарбоксилатів.

Існує також невизначений тип до якого входять сидерофори, основу яких складають ароматичні кільця (оксазол, піразин) та сидерофори з невідомою структурою [Chen, et al., 2019].

Багато бактерій і грибів здатні виробляти більше одного типу сидерофорів або мають більше однієї системи поглинання заліза для поглинання кількох сидерофорів.

1.2.1. Гідроксаматний тип

Прикладом таких сидерофорів може бути сімейство марінобакинів А, В, С, D, E, F, що були виділені у бактерії *Marinobacter sp.* Через те, що в складі марінобактину присутній полярний гідрофільний пептидний остов та неполярний гідрофобний залишок жирної кислоти, цей сидерофор має амфіфільні властивості, а також деякі прояви фотореактивності [Kem et al., 2015].

Також прикладом амфіфільних сидерофорів можуть бути амфібактини, синтезовані морською бактерією *Vibrio sp.* Амфібактини мають, як і марінобактин, головний пептидний ланцюг, який зв'язаний з жирнокислотним радикалом. Цей тип сидерофорів є дуже цікавим, адже він асоційований з клітиною бактерії. Ця особливість надає амфібактинам певну функцію – захист від дифузії сидерофорів в зовнішнє морське середовище [Leventhal et al., 2018].

Також до гідроксаматів відносяться деякі макроциклічні сидерофори: алкалігін, бісукаберин, авароферрин, путребактин. Бісукаберин був виділений у *Alteromonas haloplanktis* та *Tenacibaculum mesophilum*. При вивченні цього сидерофору виявилась його дія як протиракового засобу шляхом інгібування інвазивних мікрокапілярних клітин карциноми та лейкемії, що підвищує сенсibiliзацію ракових клітин до цитолізу [Chen et al., 2019].

Нещодавно знайдений сидерофор талассозамід у бактерії *Thalassospira profundismaris*, показав антимікробні властивості. Він має циклічну структуру, яка складається з трьох гідроксамових кислот. Цікавою його здатністю є інгібування росту таких бактерій як *Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa* при чому в природному середовищі їх дія не викликає побічної токсичності.

Досить перспективними є нещодавно виділені сидерофори альбіспоракхелін та сімейство десферріюксамінів із морських актиноміцетів *Amycolatopsis albispora* та *Salinispora tropica*. Вони є дуже сильними хелаторами, тому їх можна використовувати для лікування перенавантаження тканин залізом. Окрім того десферріюксамін В, будучи одним з найсильніших хелаторів заліза, здатен формувати стабільні комплекси з Ti (IV) [Jones et al., 2017; Roberts et al., 2012].

1.2.2. Катехолатний тип

До катехолатів морських бактерій можна віднести нігрибактин, виділений у бактерії *Vibrio nigripulchritudo*. Як і всі катехолові сидерофори він має сильні хелатуючі властивості. Окрім того він здатний впливати на експресію гену *sra*, що відповідає за синтез протеїну А – одного з основних поверхнево-зв'язаних факторів вірулентності, тим самим нігрибактин є сам фактором вірулентності. В подальшому стало зрозуміло, що ця його властивість не є характеристикою як сидерофору, бо аналогічні дослідження над індуктивною здатністю до *sra* гену проводились з ентеробактином – також катехолатним сидерофором і результат виявився негативним [Nielsen et al., 2012].

Ще одним катехолатним сидерофором є ванхробактин, виділений у морської бактерії *Vibrio anguillarum*. В своєму складі він містить залишки двох амінокислот: аргініну та серину зв'язаних з 2,3-дигідроксибензольною частиною. Його катехолатані та саліцилатні залишки являються потенціальними бідентантними координаційними центрами зв'язування заліза, що забезпечує високу силу хелатування, він грає ключову роль у живленні *V. anguillarum* залізом [Soengas et al., 2006].

Морські ціанобактерії роду *Synechococcus* здатні синтезувати досить складний катехолатний сидерофор анахелін та його ізомери. Він складається з трьох основних частин: перша частина є ароматичною речовиною подібною алкалоїдам – це дигідроксихінолін, який пов'язаний з трипептидом.. Останньою частиною є специфічний полікетид, що може відрізнитись у ізомерів анахеліну. Полікетид є хромофором сполуки здатним поглинати електро-магнітні хвилі та надавати забарвлення сидерофору, атакож було досліджено, що анахелін має антибіотичні властивості проти мікроскопічної водорості *Kirchneriella contora*, вони зумовлюються саме полікетидною частиною, яка не приймає участі в хелатуванні [Årstølet et al., 2019].

1.2.3. Гідроксикарбоксилатний тип

Представником морських гідроксикарбоксилатів може бути вібріоферрин, виділений спочатку у естуарної бактерії *Vibrio parahaemolyticus*, а потім у *Marinobacter* sp., що живуть у морі. Цей сидерофор є бідентантним лігандом, складається з 2-кетоглутарату, L-аланіну, етаноламіну та цитрату. Вібріоферрин є одним з найслабших морських хелаторів заліза, проте це не єдина його характеристика, він також має специфічну властивість. Взагалі для морських сидерофорів властива фотореактивність, тобто в своєму складі вони містять групи здатні до фотолізу комплексу з залізом в присутності ультрафіолетового світла. Такими сидерофорами є петробактин, аквахеліни, марінобактини. Це є еволюційною пристосованістю мікроорганізмів до біодоступності заліза, за допомогою фотолізу гальмується колообіг заліза в морському середовищі, для того щоб воно не вступало в редокс реакції та довше перебувало в розчинній формі [Fujita et al., 2011].

Вібріоферрин має найвищу фото реактивність (рис. 2).

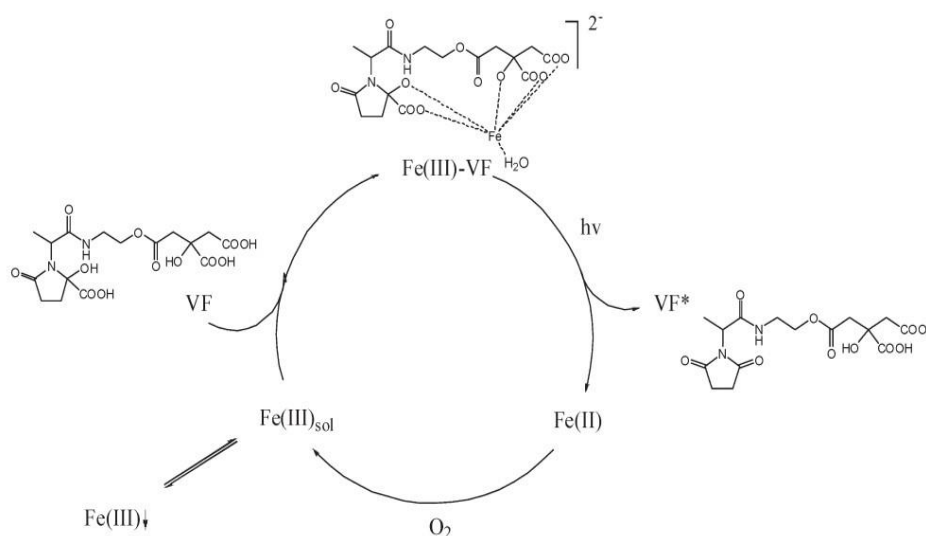


Рис. 2. Фотореактивація вібріоферрину [Amin et al., 2009].

Як уже говорилося раніше здатність до фотолізу зумовлюється наявністю фотореактивних груп. Такими групами є залишки гідроксикарбонових кислот. При фотолізі комплексу сидерофору з залишком гідроксикарбоксилату та Fe(III) утворюється окислений ліганд з оксикарбоною кислотою та вивільняється Fe(II) (Рис. 5). Так у петробактина є залишок цитрату, у марінобактину залишок гідроксипарагінової кислоти, а вібріоферрин є сам похідним гідроксикарбоною кислоти та трьох амінокислот, вони складають його основну структуру, тому він має дуже високу фотореактивність, інші структурні частини не заважають цитрату формувати основну властивість [Amin et al., 2009].

1.2.4. Змішані типи. Гідроксамати/гідроксикарбоксилати

Одним з найвідоміших сидерофорів цього типу є аеробактин, знайдений у *Vibrio sp.* Головна частина його складається з одного залишку лимонної кислоти та двох лізіннів і все це з'єднано з двома метильними радикалами. Через відсутність гідрофобної частини, як у попереднього сидерофору, аеробактин має слабкі амфіфільні властивості, проте йому притаманна фотореактивність [Amin,etal., 2009].

Імакобактин, сидерофор знайдений у бактерії *Variovorax sp.*, є сидерофором, що має головну пептидну гідрофільну частину з'єднану з залишком жирної кислоти. Так, імакобактин має і амфіфільні властивості і високу силу хелатування, проте більш цікаві його специфічних властивості, а саме те, що імакобактин здатний до редукції заліза не під дією світла, тобто він відновлює самостійно Fe^{3+} до Fe^{2+} , шляхом переходу заряду від ліганда до металу. Це є одним з типів поглинання та дисиміляції заліза за допомогою сидерофорів, при чому найскладнішим. Окрім цього імакобактин має високу специфічних до Ga(III), Al(III), Au(III) та здатний формувати з ними стабільні

аддукти. А також чистий ліганд показав антимікробну активність проти бактерії *Staphylococcus warneri*.

Ціанобактерії також здатні до синтезу сидерофорів. Шизокінен являється основним сидерофором, що синтезують морські ціанобактерії родів *Prochlorococcus*, *Synechococcus*. Шизокінен є неамфіфільним дигідроксаматним сидерофором схожим по структурі на аеробактин, що містить також залишок цитрату. Цей залишок пов'язаний з двома залишками аміно-3-гідроксиацетиламінопропанової кислоти. Загалом шизокінен здатний формувати шість міцних зв'язків з йоном заліза, але також існує афінність до Купруму, Галію, Нікелю, Кобальту, Цинку. Через наявність цитрату є здатність до фотореактивності, хоч і нижчої, ніж у аеробактина [Khan et al., 2017].

1.2.5. Змішані типи. Гідроксикарбоксилати/катехолати

До сидерофорів цього типу належать петробактин та петробактин сульфонат, знайдені у бактерії *Marinobacter carbonoclasticus* та *Marinobacter aquaeolei*. Через наявність цитрату ці сидерофори мають високу фотореактивність, а наявність біс-спермідинового скелету, з'єднаного з двома 3,4-дигідроксибензольними залишками забезпечує високу специфічність до заліза та утворення тетрадентантного зв'язку. При чому петробактин сульфонат є одним з небагатьох представників сидерофорів у складі яких є залишок сульфонової кислоти. Сульфонат покращує гідрофільні властивості ароматичної основи петробактина, а також підвищує стійкість проти оксидативних процесів зі збільшенням стабільності комплексу з залізом [Homann, et al., 2009].

Два сидерофори альтеробактин А та альтеробактин В, що синтезуються морською бактерією *Alteromonas luteoviolacea*, мають дуже високу спорідненість до іонів заліза. Альтеробактин А в своєму складі містить циклічну систему сформовану амінокислотними залишками. Цікаво те, що

деякі з цих амінокислот є досить нетипічними та зустрічаються рідко. Ними є 4,8-діаміно-3-гідроксиоктанова та треогідроксиаспарагінова кислоти. В середовищі з високим вмістом заліза альтеробактин існує в формі А, проте коли вміст іонів стає дуже низьким відбувається процес гідролізу сидерофору, тому він перетворюється в В форму яка вже має аліфітичну структуру [Капоп et al., 2003].

Також сидерофори псевдоальтеробактини А і В, що синтезуються бактерією *Pseudoalteromonas sp.*, відносяться цього типу. Вони в своєму складі, як і петробактин сульфонат, містять сульфонований катехолатний залишок, а також каркас, що складається з двох залишків гідроксиаспарагінової кислоти. Були проведені досліді над ефективністю сидерофорів до хелатування заліза та над їх активністю за допомогою CAS аналізу і псевдоальтеробактини показали досить високий рівень [Butler, 2005].

1.2.6. Змішані типи. Гідроксамати/катехолати

Перший представник – сімейство лістабактинів А, В та С, отримані у бактерії *Pseudoalteromonas sp.*, показали високу активність в зв'язуванні йона Феруму через наявність в складі декількох залишків гідроксамових кислот та одного катехолу. При чому сила хелатування лістабактинів оцінюється вищою порівняно навіть з трисгідроксаматними сидерофором дисферріоксаміном В, але нижчою порівняно з трискатехолатним ентеробактином.

У бактерії *Vibrio anguillarum*, *Acinetobacter baumannii* був знайдений специфічний сидерофор ангібактин. Він в своєму складі містить один залишок катехолу, один залишок тіазолу пов'язаний з одним залишком імідазолу гідроксаматним зв'язком. Хоча високою хелатуючою здатністю не володіє та через наявність аж трьох ароматичних систем у складі ангібактин має досить високі цитотоксичні властивості. Були проведені досліді щодо

цитотоксичності до клітин лейкозу у мишей і результат виявився позитивним. А ще ангібактин є важливим фактором вірулентності деяких патогенних бактерій, наприклад *Acinetobacter baumannii* [Lee et al., 2018].

1.2.7. Інші типи сидерофорів

Пісцибактин, виділений з патогенних морських бактерій *Photobacterium piscicida* та *Vibrio anguillarum* являється фактором вірулентності. Він містить фенольне кільце, два залишки тiazолу та один тiazолін. Що цікаво у бактерії продуцента пісцибактин служить більше ключовим фактором патогенності, аніж хелатором металів, афінність до заліза у нього досить слабка порівняно з іншими сидерофорами бактерій продуцентів пісцибактину. Проте є катехолатний ванхробактин, ось він саме забезпечує бактерію залізом [Balado et al., 2018].

Новий сидерофор тетраазолміцин, що синтезується бактерією *Streptomyces olivaceus*, є досить цікавим. Основу його скелету складають бензольні, оксазольні та тiazольні кільця. Через наявність такої складної структури з ароматичних кілець сидерофор має високу афінність та стабільність комплексу не тільки з Fe^{3+} , а й з Cu^{2+} та Zn^{2+} . В подальшому велись дослідження над антимікробною активністю тетраазолміцину і дізналися що в вільному стані сидерофор не проявляє пригнічення росту бактерій. В комплексній формі з Ферумом антагонізм також не проявляється до досліджуваних *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micobacterium gilvum*, *Candida pseudorugosa*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, не проявляється інгібування клітин аденокарциноми легень людини та клітинної лінії макрофагів мишей. Проте проявляється слабка антимікробна активність до *Klebsiella pneumoniae* в комплексі з Zn^{2+} . Це сприяло виникненню теорії, що антимікробну активність оксазольно-тiazольних сидерофорів забезпечує йон цинку [Chen et al., 2019].

1.3. Біосинтез морських сидерофорів та їх транспортна функція

Взагалі у морських бактерій, як і у наземних організмів існує два основних шляхів біосинтезу сидерофорів: NRPS залежний та NRPS незалежний. NRPS (нерибосомальна пептидсинтетаза) – це мультидоменний ферментативний комплекс, який складається приблизно з 4,5 тисяч амінокислотних залишків, має функціональні модулі. Кожен функціональний модуль відповідає за модифікації та приєднання структурних елементів до сидерофору. За приєднання в багатьох сидерофорах, де основу складає деяка амінокислота, відповідає модуль, що складається з трьох доменів [Абатуров, 2018].

Біосинтез сидерофорів протікає двома шляхами: нерибосомальний пептидний синтез (NRPS – від англ. nonribosomal peptide synthesis) та NRPS-незалежний шлях (NIS). NRPS-шлях веде до утворення пептидних сидерофорів, до складу яких входять непротеїногенні амінокислоти та їх похідні, синтез таких сидерофорів відбувається без використання РНК як матриці [Challis, 2005]. Пептиди, що утворюються в результаті, зазвичай є короткими олігомерами від 2 до 48 залишків амінокислот. По NRPS-шляху відбувається синтез багатьох сидерофорів: ієрсиніобактин, ентеробактин, вібріобактин, антибіотики пеніцилін та ванкоміцин також є вторинними метаболітами NRPS-шляху.

Синтез та модифікація сидерофорів по NRPS-шляху здійснюється поетапно на мультимодальній NRP-синтетазі. Функціональну роль доменів NRP-синтетази можна визначити так:

- 1) активація амінокислот для пептидного синтезу через утворення тіоефірів;
- 2) утворення пептидного зв'язку в PCP-доміні (від англ. peptidyl carrier protein – білок-носіє пептиду);

3) модифікація амінокислот, наприклад, епімеризація, що призводить до ізомеризації L-амінокислоти в D-енантіомер;

4) переестерифікація пептидного ланцюга з подальшим звільненням кінцевих метаболітів шляхом гідролізу або макроциклізації.

NIS-шлях синтезу сидерофорів здійснюється в результаті конденсації різних елементів, як правило, дикарбонових кислот (сукцинат, цитрат, α -кетоглутарат) з діамінами, аміноспиртами, спиртами. По NIS-шляху відбувається синтез аеробактину, ахромобактину, ризобактину, вібріоферину та ін. NIS синтетази не гомологічні синтетазам NRPS-шляху, вони, в першу чергу, каталізують утворення амідних та ефірних зв'язків між органічними кислотами та аміногрупами/гідроксилами [Bailey, et al., 2018; Chen, et al., 2019].

Для використання сидерофорів мікроорганізми мають регуляторні системи, що включають у собі ферменти та транспортні системи, які узгоджують процеси їх біосинтезу, секреції, зв'язування та звільнення заліза. Після зв'язування сидерофору з Fe^{3+} здійснюється транспорт захопленого іона заліза у цитоплазму клітини мікроорганізму (рис. 3).

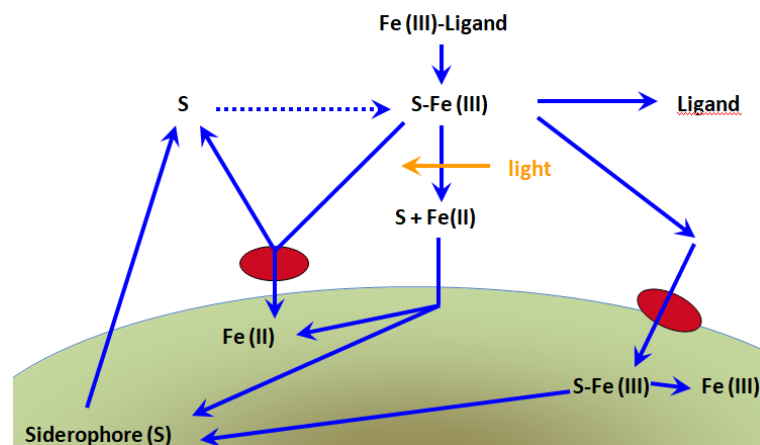


Рис. 3. Шляхи транспорту заліза усередину клітин [Krewulak et al., 2008]

Транспорт може бути здійснений двома шляхами, або комплекс сидерофор- Fe^{3+} диссоціює на поверхні клітини і тоді іон Fe^{3+} проникає

поодинокі, або комплекс не дисоціює і іон Fe^{3+} транспортується до цитоплазми у складі комплексу.

1.4. Використання морських сидерофорів

Через те, що сидерофори мають досить унікальні та цікаві властивості, головною з яких є здатність хелатувати по перше іони заліза, а також інших металів (цинк, мідь, хром, свинець), їм все більше знаходять використання в біотехнології, медицині, екології, промисловості та інших сферах життя.

1.4.1. Очищення морських водойм

Наземне середовище характеризується високим вмістом поживних речовин, перш за все мінералів, що необхідні для нормальної роботи метаболічних реакцій різноманітних організмів, метали являються факторами росту, виступаючи кофакторами для багатьох важливих для життя ферментів, неметалічні елементи такі як сірка, азот, вуглець є незамінними в побудові біоматеріалів. Проте це все містить і морське середовище, його не можна назвати бідним, але тоді чому трофічні умови існування організмів настільки відрізняються? Вся справа в формі у якій знаходяться елементи, а саме в доступності тих чи інших речовин, щоб бути поглинутими організмами і в морській воді з цим постають великі проблеми. Ці проблеми були вже раніше описані у вступі, тому акцентувати увагу на цьому я не буду, проте хочу розповісти як і навіщо треба покращити біодоступність речовин, а саме металів, бо з ними постає більше всього проблем в поглинанні.

Сьогоднішнє екологічне становище можна назвати лише, м'яко кажучи, не зовсім задовільним. Активний розвиток промисловості призвів до забруднення різних середовищ, не винятком стало і морське. Найбільшу проблему в забрудненні становлять синтетичні речовини: пластмаси, фарби, продукти переробки нафти й інші. Вони містять у своєму складі полібензойні

ароматичні речовини, що здані вбивати незахищені організми. Толуол, бензпірен, нафтол, антрацен – всі ці речовини є канцерогенними та викликають неповоротні зміни в геномі організмів, викликаючи мутації та смерть. Додає також проблем стійкість цих речовин до зовнішніх факторів, відносна стабільність.

Проте через тривале сумісне існування організмів у отруйному середовищі, виникли спеціальні механізми деградації цих канцерогенів. Добре це демонструється у мікроорганізмів, які навчилися не тільки редукувати ароматичні речовини, а й використовувати їх на користь, як джерело вуглецю в метаболічних процесах. Для цього вони використовують спеціальні ферменти, що здатні розкладати полібензойні речовини на простіші складові: феноли, катехоли. Ці ферменти мають назву монооксигенази та діоксигенази, що відносяться до класу оксигеназ. Вони здатні вбудовувати атоми кисню в молекулу речовини, окислюючи її та ламаючи [Nayaishi, 2004].

Ці ферменти виконують свої функції відмінно, але не все так просто. Всі оксигенази потребують для роботи коферменти, в їхньому випадку ними виступають йони металів. Згадуючи те, що морська вода бідна на йонні форми металів та ще й 50% оксигеназ потребують Fe^{3+} , постає нова проблема. Так, ми маємо ферменти які руйнують ароматичні речовини, але що робити коли немає кофакторів для їх роботи? Ось тут і знаходиться місце сидерофорам, які вловлюють йони металів та можуть їх віддавати на різні потреби клітини, в тому числі й роботу оксигеназ. Таким чином забезпечивши мікроорганізми сидерофорами можна проводити ефективну очистку водойм від ароматичних речовин-канцерогенів [Gaonkar et al., 2017].

У 2002 році відкрита бактерія *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* яка не містить у своєму складі оксигенази, що здатні руйнувати полібензойні речовини, проте вона містить ферменти, що руйнують аліфатичні вуглеводні. Вони також потребують залізо як кофактор, транспортом якого займається

петробактин. *M. hydrocarbonoclasticus* та інші представники цієї родини є ефективними редуцентами простих органічних речовин, тому їх використовують при очищенні морських водойм від нафти та продуктів її переробки [Handley et al., 2013].

1.4.2. Інші сфери використання

Через те що сидерофори визначають одну з головних характеристик в живленні організмів, а саме забезпечення важливим мікроелементом залізом, вони впливають на ріст та розвиток клітин.

Важливим використанням сидерофорів може бути біоремедіація природних середовищ, які перенавантажені металами. Метали є необхідними для життя, проте в певній концентрації. Коли концентрація металу стає надвисокою, він починає руйнувати сталу роботу організму, гомеостаз, вступаючи в реакцію з внутрішніми компонентами клітин, в більшій мірі з протеїнами, полісахаридами, ліпідами. Мембрани не можуть правильно формуватись і це призводить до загибелі. Сидерофори здатні проводити очистку середовища з підвищеною концентрацією металів, хелатуючи їх. Це нормалізує стале життя організмів в середовищі [Ahmed, et al., 2015].

Проблеми в перенавантаженні металами існують не тільки в природних середовищах, а й в самих живих організмах. Існує купа хвороб пов'язаних з неправильним метаболізмом металів. В лікуванні таких випадків також можна використовувати сидерофори. Важкі метали такі як Свинець, Олово, Ртуть можуть викликати чимало проблем будучи отруйними для організму, проте сидерофори з сильними хелатуючими властивостями здатні захоплювати ці метали, є приклади коли сидерофори накопичували в собі навіть йони Плутонію (IV) та деяких інших радіоактивних елементів.

Було досліджено, що деякі сидерофори, наприклад бісукаберин, ангібактин, здатні викликати супресію клітин лейкемії, викликаючи

цитотоксичний ефект. Тому можна їх можна використовувати при лікуванні злоякісних утворень.

Деякі сидерофори, наприклад таласозамід, фрадіамін здатні викликати пригнічення розвитку деяких патогенних штамів мікроорганізмів, при чому вони є досить специфічними антимікробними агентами, що не викликають побічної токсичності. Це може бути дуже корисним при лікуванні бактеріальних захворювань.

Цікавий катехолатний сидерофор анахелін може використовуватись в антибактеріальному захисті поверхонь. Анахелін має дуже сильні хелатуючі властивості, тому здатний зв'язуватись навіть з оксидами металів на поверхні металевих предметів. У багатьох патогенних бактерій сидерофори є ініціаторами формування біоплівки, вони допомагають прикріплюватись на поверхні. Так ось додавання комплексу з сидерофору та поліетиленгліколю (ПЕГ), засобу що інгібує ріст біоплівки, на поверхні металевих предметів запобігає формуванню біоплівки, анахелін зв'язує ПЕГ та якорить його на поверхні металу та не дає можливості формуватись колоніям бактерій. Окрім ПЕГ анахелін здатний зв'язуватись також з деякими антибіотиками запобігаючи ще й розмноженню патогенів. Тому маючи цю здатність анахеліну, можна обробляти різні поверхні, забезпечуючи їх стерильність надовго [Årstøl, et al., 2019].

Насправді прикладів використання сидерофорів морських бактерій набагато більше, але далеко не всі вони є достатньо оптимізованими або поки що в розробці, хоча є дуже перспективними. Тому напрямок вивчення і освоєння технологій заснованих на сидерофорах може відкрити нові досягнення в медицині, екології, промисловості та здатність повністю контролювати колообіг металів на планеті.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дипломна робота була виконана у Біотехнологічному науково-навчальному центрі (БННЦ) Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

2.1. Штами морських бактерій та умови їх культивування

Під час виконання дослідження були використані штами морських бактерій, виділені у БННЦ з поверхні мідій *Mytilus galloprovincialis*, проживаючих у Чорному морі.

Були досліджені 3 штами псевдомонад та 2 штами бацил, які за попередніми даними виявили найбільшу здатність до продукції сидерофорів.

Штами *Pseudomonas aeruginosa* були позначені як М1, М3, М4; штами бацил – *Bacillus subtilis* (МС3) та *Bacillus atrophaeus* (МН4). Також був застосований колекційні штами *P. aeruginosa* PA01.

Культивування проводили у моно- та ко-культурах, варіанти яких наведено у табл. 2.

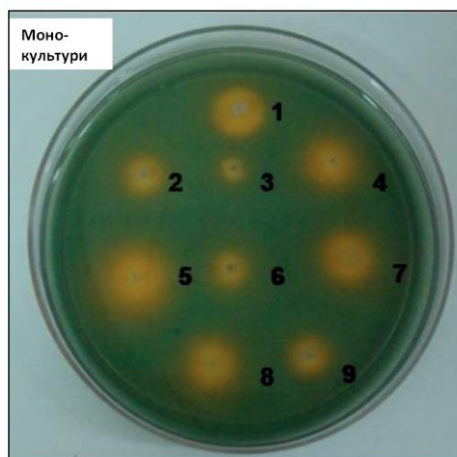
Таблиця 2

Схема ко-культивування морських бактерій

Варіант ко-культури	Скорочене позначення	Варіант ко-культури	Скорочене позначення
<i>B. subtilis</i> МС3 + <i>P. aeruginosa</i> М1	МС3+М1	<i>B. atrophaeus</i> МН4 + <i>P. aeruginosa</i> М1	МН4+М1
<i>B. subtilis</i> МС3 + <i>P. aeruginosa</i> М3	МС3+М3	<i>B. atrophaeus</i> МН4 + <i>P. aeruginosa</i> М3	МН4+М3
<i>B. subtilis</i> МС3 + <i>P. aeruginosa</i> М4	МС3+М4	<i>B. atrophaeus</i> МН4 + <i>P. aeruginosa</i> М4	МН4+М4
<i>B. subtilis</i> МС3 + <i>P. aeruginosa</i> PA01	МС3+М4	<i>B. atrophaeus</i> МН4 + <i>P. aeruginosa</i> PA01	МН4+М4

У ко-культурах поєднувала грам-позитивні та грам-негативні штами.

Штами були відібрані за результатами попереднього якісного визначення здатності монокультур до продукції сидерофорів з використанням CAS агару [Schwyn, 1987]:



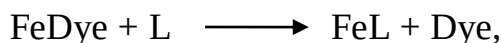
Культивування бактерій відбувалось в конічних колбах з середовищем LB складу, г/л: пептон – 15; дріжджовий екстракт – 10; NaCl – 5; морська вода – 1 л. Готове середовище стерилізувалось в автоклаві 15 хвилин при 121 °С. Морську воду перед використанням фільтрували.

У колби об'ємом 300 мл поміщали 95 мл середовища та додавали 5 мл добової суспензії бактерій з оптичною густиною 0,2 при 540 нм. У разі ко-культур вносили по 2,5 мл суспензії кожного виду мікроорганізмів. Таким чином, стартові концентрації бактерій у моно- та ко-культурах були однаковими. Культивування здійснювали впродовж 72 годин при 30 °С та перемішуванні при 150 об/хв.

По закінченні культивування з кожної колби відбирали по 200 мкл суспензії для визначення її оптичної густини, яку визначали спектрофотометрично у 96-лункових планшетах. Після цього культури стандартизували за вмістом клітин, відбирали по 5 мл суспензій у центрифужні пробірки та центрифугували 20 хв при 3000 об/хв.

2.2. Визначення вмісту сидерофорів

Кількісний вміст загальних сидерофорів визначали з використанням CAS-методу [Schwyn, 1987] в його мікропланшетній модифікації [Aroga, 2017]. Принцип аналізу базується на хімічному рівнянні:



де L – ліганд (сидерофор), Dye – барвник (хромазуrol).

Приготування CAS реагенту. Розчин для CAS аналізу складається з основних речовин та буферу. Для приготування розчину основних речовин використовували три компоненти, які додавали до 50 мл дистильованої води у мірній колбі на 100 мл: 6 мл 10 мМ гексадецилтриметиламмоній броміду (HDTMA), 1,5 мл розчину хлориду заліза (III) (1 мМ $\text{FeCl} \times 6\text{H}_2\text{O}$ у 10 мМ HCl) та 7,5 мл 2 мМ хромазуrolу S.

Буферний розчин готували на основі піперазину, 4 г якого поміщали до 10 мл дистильованої води. Розчин обережно перемішували і до нього додавали ще 6,5 мл 10 М хлоридної кислоти. Приготований розчин змішували з розчином основних речовин й до суміші додавали 4 мМ сульфосаліцилової кислота для покращення спектрофотометричних властивостей розчину та збільшення його терміну зберігання. Загальний об'єм реагенту доводили до 100 мл дистильованою водою. Реагент зберігали у темряві за кімнатної температури у поліетиленовому флаконі.

Визначення вмісту сидерофорів. З кожного безклітинного супернатанту, одержаного після центрифугування, вносили по 100 мкл у 3 лунки 96-лункового планшету и додавали у кожну лунку по 100 мкл CAS реагенту. Витримували 1 годину за кімнатної температури та спектрофотометрували при 630 нм. У контрольні проби замість супернатантів культур вносили 100 мкл поживного середовища LB.

Вміст сидерофорів виражали в одиницях сидерофорів (SU, %), які розраховували за формулою [Raune, 1994]:

$$SU (\%) = [(A_r - A_s) / A_r] \times 100,$$

де: A_r – адсорбція контрольної проби (CAS + середовище LB), A_s – адсорбція дослідної проби (CAS + супернатант).

Спектрофотометричні вимірювання проводили на приладі SmartSpec Plus (Bio-Rad, Hungary) при відповідних довжинах хвиль.

Усі експерименти проводили у 3 незалежних дослідях з 3 повторами у кожному.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного аналізу. Розраховували середні значення показників ($\bar{X}$) та їх стандартну помилку ($S\bar{X}$). Достовірність відмінностей між середніми визначали за критерієм Стюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ($p \leq 0,05$). Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Технологічна схема одержання сидерофорів морських бактерій

Технологічна схема отримання сидерофорів морських бактерій складається з низки етапів (рис. 4).

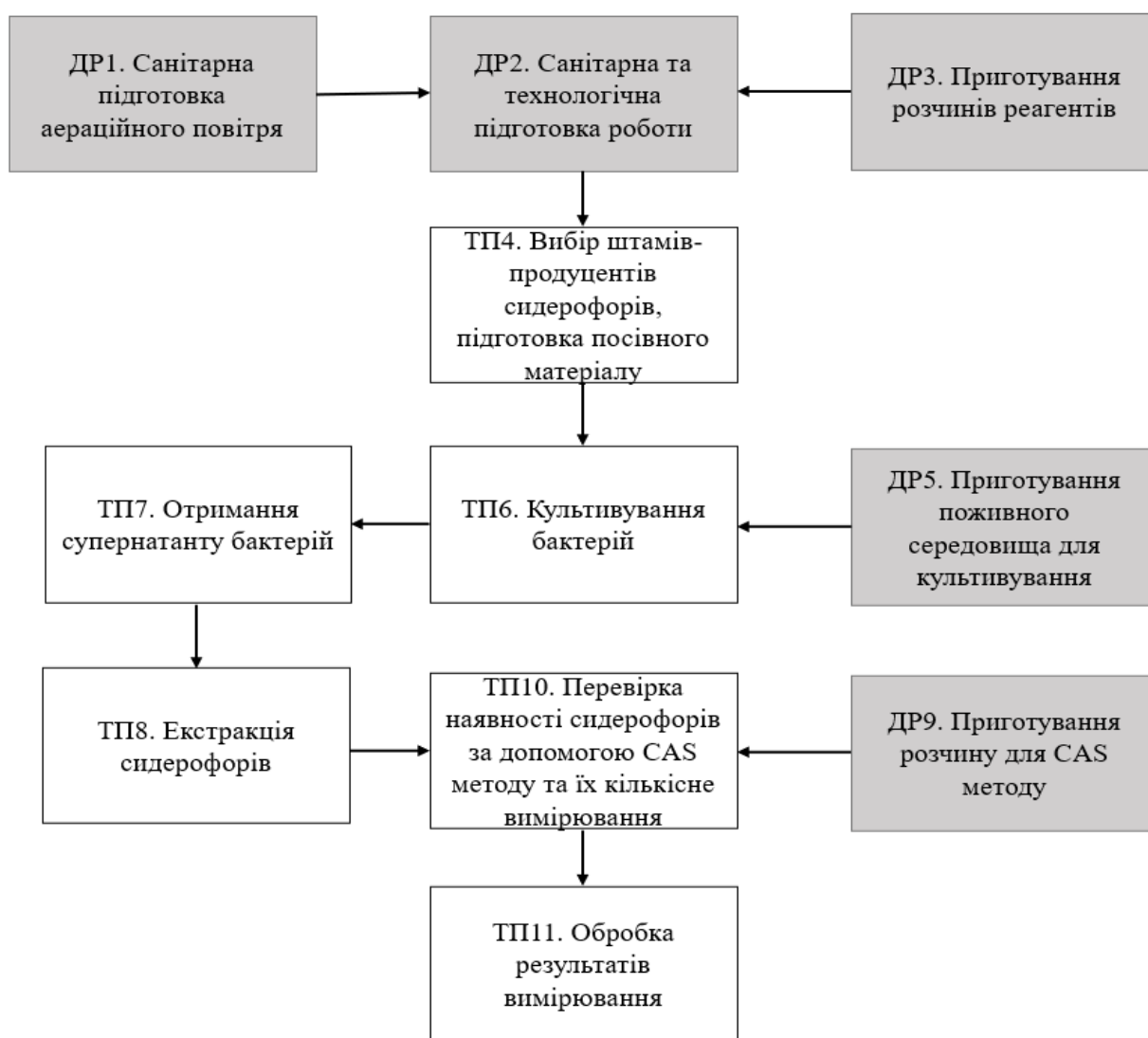


Рис. 4. Технологічна схема виробництва сидерофорів

Стадії основного технологічного процесу (ТП) складаються з:

ТП4. Вибір штамів-продуцентів сидерофорів. Для роботи обираються певні штами бактерій, виділені з мідій Чорного моря, що здатні до синтезу сидерофорів.

ТП6. Культивування бактерій. Проводиться процес накопичення біомаси бактерій на приготованому середовищі. Культивування бактерій відбувається при 30 °C протягом 72 годин.

ТП7. Отримання супернатанту бактерій. Отримання надосадової рідини за допомогою методів центрифугування та мікрофільтрації з культуральної рідини, отриманої після культивування бактерій

ТП8. Екстракція сидерофорів. З отриманого супернатанту виділяються сидерофори за допомогою методів з використанням деяких розчинників: хлороформ, фенол, етиловий ефір, етанол.

ТП10. Перевірка наявності сидерофорів за допомогою CAS методу. Якісний аналіз на сидерофори. До 96-лункового планшету додаються екстракти сидерофорів кожного штаму й змішуються з CAS розчином, відбувається реакція. Потім відбувається кількісний аналіз

ТП11. Обробка результатів вимірювання. Виконується фіксування та аналіз отриманих результатів, створюються відповідні характеристики штамів.

До стадій допоміжних робіт відносяться:

ДР1. Санітарна підготовка аераційного повітря. Проводиться очистка повітря в лабораторних приміщеннях. Здійснюється контроль його чистоти.

ДР2. Санітарна та технологічна підготовка роботи. Проводиться підготовка лабораторного обладнання, стерилізація посуду, прибирання приміщень. Виконується перевірка чистоти.

ДР3. Приготування розчинів реагентів. Відбувається підготовка хімічних реагентів. Готуються їх розчини необхідні для подальших стадій роботи.

ДР5. Приготування поживного середовища для культивування. Готується середовище LB, необхідне для культивування обраних бактерій продуцентів.

ДР9. Приготування розчину для CAS методу. Проводиться приготування CAS розчину, який складається з розчину FeCl_3 , HDTMA, хромазуролу S та буферу на основі піперазину.

На рис. 5 наведені окремі стадії технології одержання сидерофорів, які були використані у даному дослідженні, проведеному у лабораторних умовах.

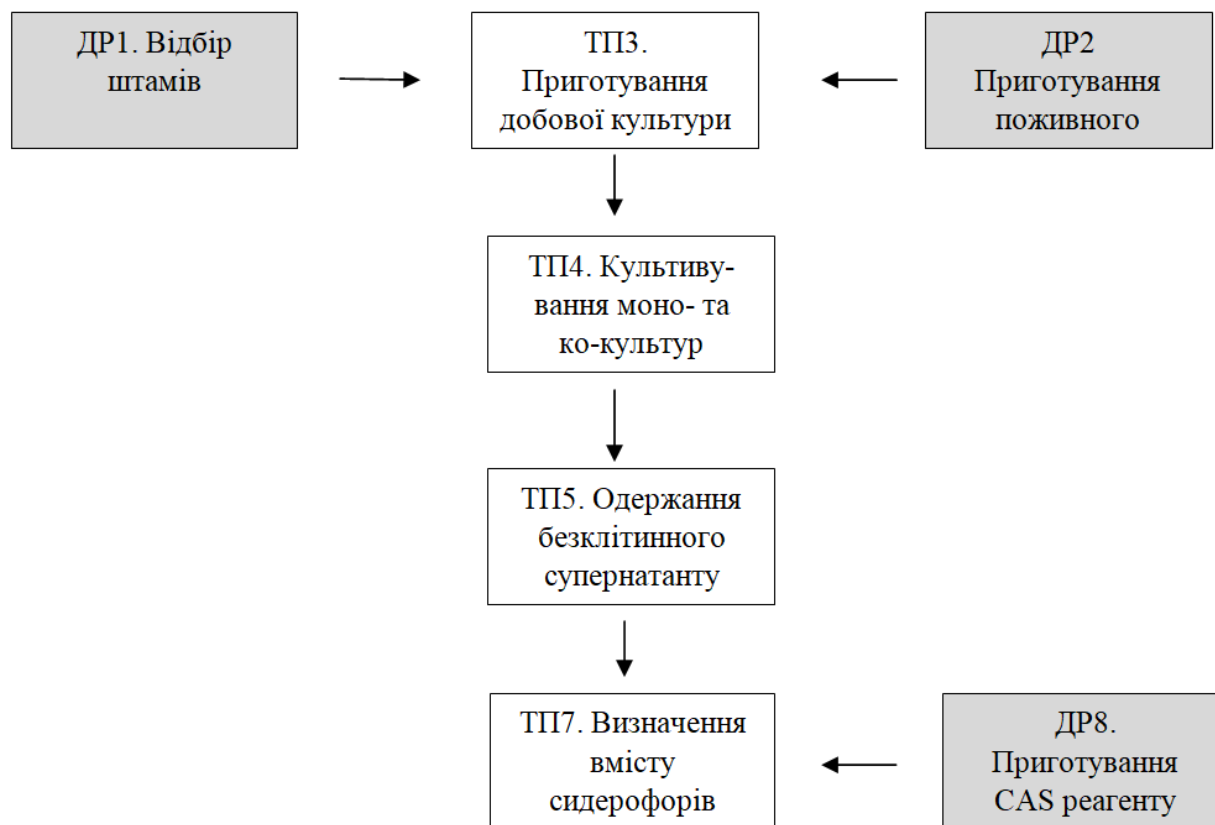


Рис. 5. Стадії технологічної схеми, що були використані у дослідженні: отримання біомаси бактерій.

Детальний опис кожної зі стадій наведений у розділі «Матеріали та методи дослідження».

3.2. Синтез сидерофорів у моно- та ко-культурах бактерій родів *Bacillus* та *Pseudomonas*, виділених з мідій Чорного моря

Результати визначення синтезу сидерофорів морськими бактеріями наведені у табл. 3. Одержані дані показали, що до найбільшої продукції

сидерофорів здатний штам *P. aeruginosa* M1 зі значенням SU 65 ± 4 %. Найменший результат показав штам *B. atrophoeus* MH4 зі значенням SU 21 ± 1 %. Загалом всі штами *Pseudomonas* показали кращі результати синтезу сидерофорів, аніж штами *Bacillus*, різниця між середніми значенням SU штамів кожного роду становить 20 ± 3 %, що є значним показником. Щоправда, *P. aeruginosa* M3 показав найменший результат серед *Pseudomonas*, який може бути подібним до результату *B. subtilis* MC3.

Таблиця 3

Вміст сидерофорів у монокультурах досліджуваних бактерій

Мікроорганізм	Вміст сидерофорів, SU, %	Мікроорганізм	Вміст сидерофорів, SU, %
<i>P. aeruginosa</i> M1	65 ± 4	<i>B. subtilis</i> MC3	31 ± 2
<i>P. aeruginosa</i> M3	36 ± 3	<i>B. atrophoeus</i> MH4	21 ± 1
<i>P. aeruginosa</i> M4	57 ± 5		
<i>P. aeruginosa</i> PA01	41 ± 3		

Можна зробити багато висновків з цих результатів. По перше у псевдомонад продукування сидерофорів відіграє більше ролей, ніж у бацил. *P. aeruginosa* є умовно-патогенною бактерією для якої продукування піовердину є одним з ключових інструментів для виживання, завдяки його продукції відбувається ефективна інвазія та створення біоплівки. Використані штами бацил в експерименті не є патогенним. Бакцилілібактин, що продукується ними, відіграє, в основному, свою пряму функцію – хелатування металів, а тому його біосинтез є більш обмеженим [Kang et al., 2019].

По друге сам бациллібактин є більш сильним хелатором, порівняно з піовердиниом, а з піохеліном так точно, тому й його необхідна кількість для засвоєння металів є меншою. Існує більша вірогідність того, що бациллібактин зв'яжеться з залізом і не буде втрачений через дифузію в навколишнє середовище. Окрім того його гідроліз в клітині відбувається таким чином, що сидерофор, вивільняючи залізо, розпадається на мономері, які легко збираються в одну структуру й використовуються повторно. З іншої ж сторони *Pseudomonas* розраховують на те, що не вся кількість сидерофорів повернеться в клітину, частина їх є необхідною для викликання імунних реакцій та для створення залізодефіциту в тканинах [Miethke et al., 2006].

І ще остання причина нижчої продукції сидерофорів у *Bacillus* – метали не є для них настільки важливими, як для *Pseudomonas*. Псевдомонадам необхідне не тільки залізо в великій кількості, а й цинк та мідь, а тому у піоверднину та піохеліну є також висока спорідненість до цих металів. Ці метали відіграють у них важливу роль в життєдіяльності, яка стосується створення факторів патогенності. Тому *Pseudomonas* необхідно значно більше металів, аніж *Bacillus* [Ghssein et al., 2016].

Результати визначення вмісту сидерофорів у ко-культурах морських бактерій представлені у табл. 4.

Навіть найменший результат, отриманий від *B. atrophoeus* МН4 + *P. aeruginosa* М3, був на 20 % вищий за найменший результат серед монокультур – *B. atrophoeus* МН4. Тому загалом можна побачити, що ко-культивування є більш ефективним порівняно з монокультивуванням.

Але, не дивлячись на міксування організмів, майже всюди зберігається кореляція з монокультурами. Найбільший показник з продукування сидерофорів показала комбінація *B. subtilis* МС3 + *P. aeruginosa* М1 зі значенням SU в 81 ± 6 %, при монокультивуванні ці організми також показали найвищі результати серед своїх родів. Таке коррелювання відрізняється лише в групі *B. subtilis* МС3 + *P. aeruginosa* РА01, яка показав

найменший результат серед кокультур з *B. subtilis*. Там *P. aeruginosa* PA01 має менший результат, порівняно з *P. aeruginosa* M3, який був найменш ефективним при монокультивуванні, проте відмінність є зовсім незначною.

Таблиця 4

Вміст сидерофорів у ко-культурах досліджуваних бактерій

Варіант ко-культури	Вміст сидерофорів, SU, %	Варіант ко-культури	Вміст сидерофорів, SU, %
<i>B. subtilis</i> MC3 + <i>P. aeruginosa</i> M1	81 ± 6	<i>B. atrophoeus</i> MH4 + <i>P. aeruginosa</i> M1	70 ± 5
<i>B. subtilis</i> MC3 + <i>P. aeruginosa</i> M3	54 ± 4	<i>B. atrophoeus</i> MH4 + <i>P. aeruginosa</i> M3	41 ± 4
<i>B. subtilis</i> MC3 + <i>P. aeruginosa</i> M4	76 ± 5	<i>B. atrophoeus</i> MH4 + <i>P. aeruginosa</i> M4	63 ± 6
<i>B. subtilis</i> MC3 + <i>P. aeruginosa</i> PA01	52 ± 4	<i>B. atrophoeus</i> MH4 + <i>P. aeruginosa</i> M4	49 ± 5

Взагалі цей напрямок досліджень є складним, бо необхідно враховувати всі аспекти одного організму, які можуть вплинути на життєдіяльність іншого. Сюди необхідно враховувати першочергово метаболізм, фізіологію, культуральні характеристики. Через складне моделювання систем часто користуються лише емпіричними методами. Але загалом причиною, чому ко-культивування виявилось ефективнішим за монокультивування, може бути або синергія між організмами, або аллелопатія.

У першому випадку між організмами виникають синтрофні взаємодії, коли вони здатні підсилювати життєдіяльність один одного за рахунок обміну метаболітами, необхідними для росту. Такі ко-культури характеризуються високою біомасою, швидким ростом та переважанням первинного метаболізму. У іншому випадку, при аллелопатії між

організмами існують антагоністичні взаємодії. Вони вже будуються не на розподілі поживних речовин, а на взаємному їх відбиранні й інгібуванні росту один одного. Цьому сприяє не тільки конкуренція за ресурси, а й вторинний метаболізм. Продукуються антибіотики, токсини. Такі взаємодії посилюють біосинтетичні властивості обох організмів, які активуються знову ж таки дією вторинних метаболітів, принцип зворотного позитивного зв'язку [Marmann et al., 2014].

Можна вважати, що за умов співіснування спостерігається саме аллелопатія й завдяки конкуренції за залізо посилюється біосинтез сидерофорів, що зумовлено епігенетичними змінами в клітинах, спрямованими на зростання експресії факторів транскрипції біосинтетичних кластерів генів NRPS й самих кластерів генів [Challis, 2005].

На наступному етапі роботи було проведений порівняльний аналіз очікуваного та реального вмісту сидерофорів у ко-культурах. Результати наведені на рис. 6 та 7.

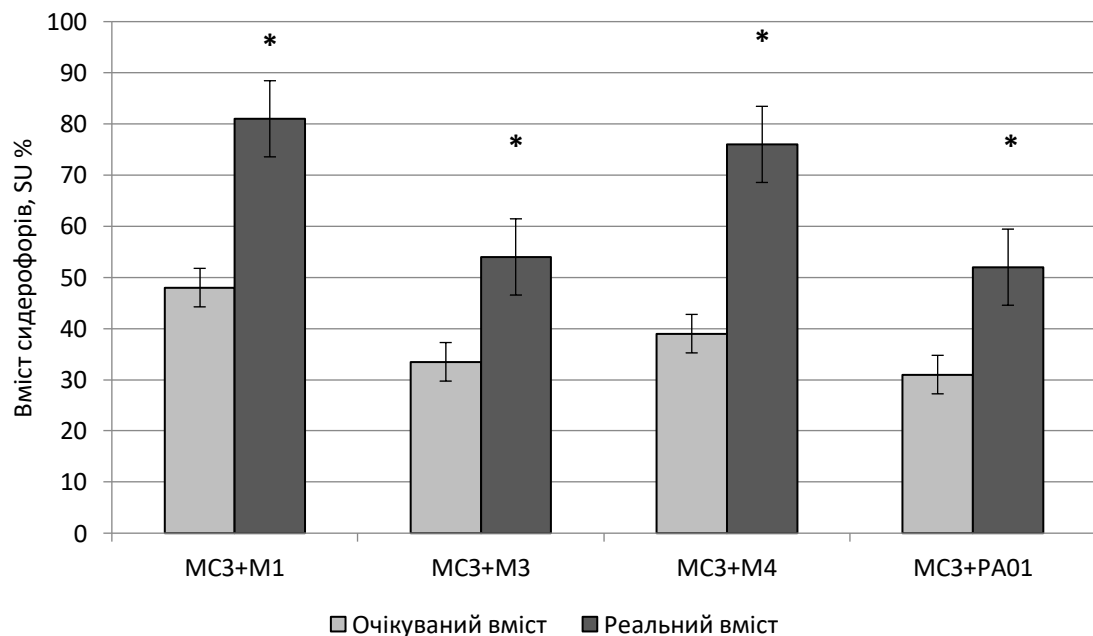


Рис. 6. Порівняння реального вмісту сидерофорів у ко-культурах

B. subtilis MC3 з різними штамами *P. aeruginosa* з очікуваним

Примітка: * - різниця достовірна у порівнянні з очікуваними даними

Очікувані результати розраховували як 50% від суми вмісту сидерофорів у відповідних монокультурах. Реальні результати у всіх випадках ко-культивування *B. subtilis* MC3 з *P. aeruginosa* перевищили очікувані результати в середньому на 30%. Найбільшу відмінність показала комбінація *B. subtilis* MC3 + *P. aeruginosa* M4, де різниця між очікуваним результатом та реальним склала 37%. Навпаки, найменшу різницю показала комбінація *B. subtilis* MC3 + *P. aeruginosa* M3 з показником в 20%.

Така висока різниця між очікуваним результатом та реальним пов'язана з унікальністю експерименту, таке поєднання організмів та такі умови культивування призвели до зростання продукції сидерофорів, причини чого описані поперед. Тепер ці результати можуть показати ефективність кокультивування використаних штамів *B. subtilis* та *P. aeruginosa* для побудови майбутніх експериментів.

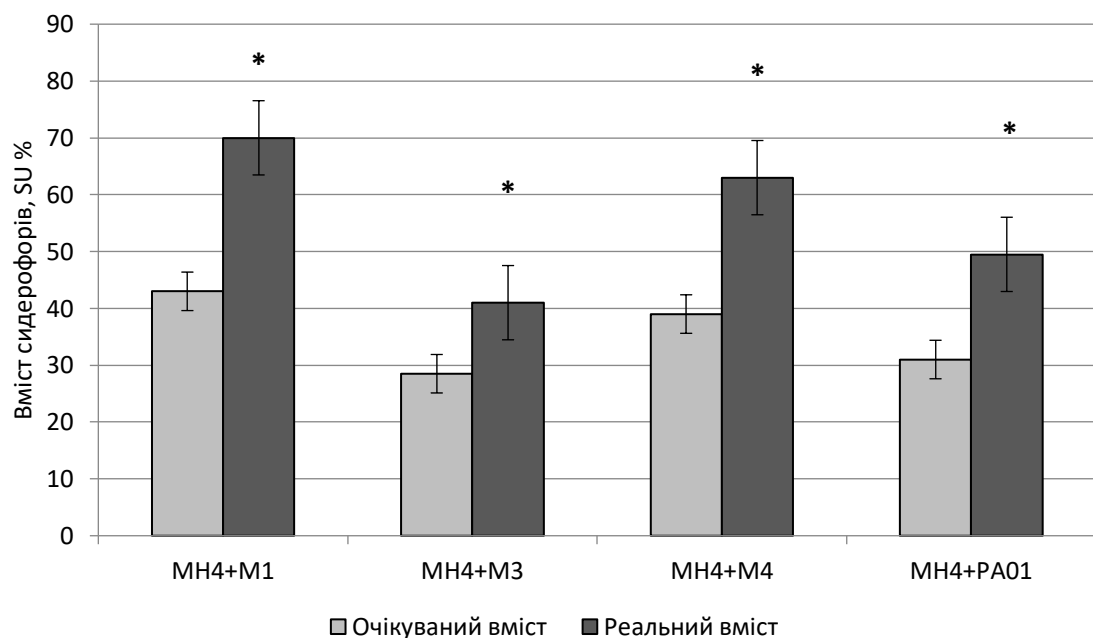


Рис. 7. Порівняння реального вмісту сидерофорів у ко-культурах *B. atrophoeus* MN4 з різними штамми *P. aeruginosa* з очікуваним

Примітка: * - різниця достовірна у порівнянні з очікуваними даними

У випадку ко-культивування *B. atrophoeus* МН4 з різними штамми *P. aeruginosa* складається аналогічна ситуація. Очкунані результати менші за реальні, але різниця між ними менша за ко-культури з *B. subtilis*, вона складає в середньому 20%. Найбільшу різницю показала комбінація *B. atrophoeus* МН4 + *P. aeruginosa* М1 з показником в 27%, найменшу ж комбінація *B. atrophoeus* МН4 + *P. aeruginosa* М3 з показником в 13%.

Така відміна між ко-культурами з *B. subtilis* МС3 та *B. atrophoeus* МН4 в різниці між реальними та очікуваними результатами пояснюється синтетичними можливостями цих двох бактерій. *B. atrophoeus* є гіршим продуцентом, що враховувалось при плануванні експерименту, а тому результати виявились більш подібними до очікуваних. *B. subtilis* виявилась в таких умовах більш активним продуцентом, ніж очікувалось.

Тим не менш, обидва варіанти ко-культивування показали вищі результати, ніж очікувалось, що є підставою для подальших поглиблених досліджень.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Різноманіття морських мікробних спільнот і хіміорізноманіття призводять до генерації численних біологічних вторинних метаболітів. Ці сполуки збільшують шанси знайти цінний препарат кандидатів [Chen et al., 2019]. Морські сидерофори є різновидом низькомолекулярних натуральних продуктів функції яких полягають у сприянні мікробному засвоєнню заліза в середовищі океану [Butler, 2005]. Морські мікроби зазвичай потребують мікромольних рівнів заліза для свого зростання, але концентрації заліза в поверхневих водах Світового океану становить лише 0,01–2 нМ. Для того, щоб подолати це нестачу заліза, морські мікроби розвинули систему доставки заліза, опосередковану сидерофорами.

Сидерофори, координовані з нерозчинним Fe(III), спочатку транспортуються в мікробні клітини за допомогою мембрано-зв'язаних залізо-сидерофорних рецепторів. Після цього залізо вивільняється із сидерофорів, що є типовим шляхом відновлення Fe(III) до Fe(II) окислювально-відновними процесами, опосередкованими мікробами [Miethke et al., 2007]. На основі ефективного механізму отримання заліза, опосередковані сидерофорами, морські сидерофори можуть бути розроблені як нові антимікробні засоби шляхом ковалентного приєднання клінічно важливих антибіотиків до морських сидерофорів або нового хелатору заліза десфералу [Roosenberg et al., 2000]. Крім того, морські сидерофори також демонструють різні неklasичні біологічні функції, наприклад, як агенти, які можуть перешкоджати регуляції кворуму та роїнню у бактерій, як медіатори взаємодій та як секретовані сигнальні молекули, що регулюють фактори вірулентності збудників [Guan et al., 2001]. Цей широкий спектр активності має великий потенціал в медицині.

Сидерофори знаходять застосування в медицині для лікування перевантаження залізом і алюмінієм та таргетної доставки антибіотиків у клітини патогенів. Розуміння механізмів дії сидерофорів сприяло розробці низькомолекулярних інгібіторів, які блокують біосинтез сидерофорів і, отже, ріст і вірулентність бактерій в організмі [Абатуров та ін., 2018; Roosenberg et al., 2000].

Крім медичної галузі сидерофори мають перспективи широкого застосування в агротехнологіях та біоремедіації.

Показано, що рослини крім власних фітосидерофорів здатні використовувати мікробні хелатори для збільшення доступності і поглинання заліза [Kraemer et al., 2006].

Сидерофори можуть зв'язувати не тільки залізо, але й інші іони металів: алюміній, галій, хром, мідь, цинк, свинець, марганець, кадмій, ванадій, цирконій, індій, плутоній, берклій, каліфорній та уран, що є підґрунтям їх використання у біоремедіації забруднених середовищ [Hider et al., 2010].

Таким чином, сидерофори з морських мікроорганізмів є важливим класом вторинних метаболітів, які, завдяки їх структурному різноманіттю та потенціалу застосування, приваблюють мікробіологів, хіміків та біохіміків. Однак, за поширеною оцінкою, менше ніж 1% виділених морських мікроорганізмів введені у культури [Blunt et al., 2016]. Важливим завданням є не тільки дослідження нових морських бактерій, здатних до продукції сидерофорів, але й встановлення шляхів біосинтезу, вивчення їх біологічної активності, з'ясування механізмів дії та розроблення методів хімічного синтезу.

У даному дослідженні розроблена загальна технологічна схема, яка може бути застосована у виробництві. У лабораторних умовах із застосуванням окремих стадій технологічної схеми встановлена здатність до синтезу сидерофорів 3 штамів псевдомонад (*P. aeruginosa* M1, M3 та M4) та 2

штамів бацил (*B. subtilis* MC3 та *B. atrophaeus* МН4), виділених з поверхні мідій Одеської затоки Чорного моря. Одержані результати, показали, що псевдомонади синтезують більшу кількість сидерофорів ніж бацили. Культивування у складі консорціумів, що містили штами *Pseudomonas* та *Bacillus*, призводить до зростання вмісту сидерофорів у порівнянні з монокультурами. Крім того, встановлено що кількість сидерофорів у ко-культурах *B. subtilis* MC3 з різними штамами *P. aeruginosa* у 1,6-2 рази перевищує просту суму цих речовин у відповідних монокультурах. Для ко-культур з *B. atrophaeus* МН4 ці відмінності становлять 1,42-1,75 рази. Таким чином, у роботі доведено, що використання ко-культивування морських бактерій є одним зі шляхів оптимізації синтезу сидерофорів.

Враховуючи, що псевдомонади та бацили синтезують різні типи сидерофорів: гідроксаматний та катехолатний, відповідно, у подальших дослідженнях є доцільним визначити не тільки вміст загальних сидерофорів, але й їх окремі типи. Така інформація щодо ко-культур буде дуже цікавою та допоможе висвітлити питання взаємодії різних видів мікроорганізмів за їх спільного існування.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено базову технологічну схему виробництва сидерофорів морськими бактеріями.
2. Встановлено, що у монокультурах штами *Pseudomonas* синтезують у 1,7-3,1 рази більше сидерофорів ніж штами *Bacillus*.
3. Показано, що вміст сидерофорів у ко-культурах є більшим у порівнянні з монокультурами. Найбільш ефективними виявилися консорціуми (*B. subtilis* MC3 + *P. aeruginosa* M1) та (*B. subtilis* MC3 + *P. aeruginosa* M4).
4. Встановлено, що реальний вміст сидерофорів у ко-культурах значно перевищує розрахунковий: на 40-100%.

СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Абатуров О.Є. Медикаментозне обмеження доступності іонів заліза для патогенних бактерій (частина 1) / О.Є. Абатуров, Т.О. Крючко // Здоров'я дитини. – 2018. – Т. 13, № 4. – С. 416–428.
2. Абатуров О.Є. Медикаментозне обмеження доступності іонів заліза для патогенних бактерій (частина 2) / О.Є. Абатуров, Т.О. Крючко // Здоров'я дитини. – 2018. – Т. 13, № 5. – С. 530–538.
3. Aguado-Santacruz, G.A.A. Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis / G.A.A. Aguado-Santacruz, B.A. Moreno-Gómez, B.B. JiménezFrancisco, et al. // Rev. Fitotec. Mex. – 2012. – V. 35. – P. 9–21.
4. Ahmed E. Siderophores in environmental research: roles and applications / E. Ahmed, S. J. M. Holmström // Microbial Biotechnology. – 2014. – V. 7. – P. 196–208.
5. Amin A. Vibrioferrin, an Unusual Marine Siderophore: Iron Binding, Photochemistry, and Biological Implications / S. A. Amin, David H. Green, C. K. Frithjof, C. J. Carrano // Inorganic Chemistry. – 2009. – V. 48. – P. 11451–11458.
6. Arora N.K. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria / N.K. Arora, M. Verma / 3 Biotech. 2017. – V. 7(6). doi: 10.1007/s13205-017-1008-y.
7. Årstøl E. Cyanobacterial Siderophores–Physiology, Structure, Biosynthesis, and Applications / E. Årstøl, M. F. Hohmann-Marriott // Marine Drugs. – 2019. – V. 17. – A.281
8. Balado M. The Siderophore Piscibactin Is a Relevant Virulence Factor for *Vibrio anguillarum* Favored at Low Temperatures / M. Balado, M. A. Lages, J.C. Fuentes-Monteverde, et al. // Frontiers in Marine Science. – 2018. – V. 9. – A. 1766

9. Bailey D. Structural and functional delineation of aerobactin biosynthesis in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / D. Bailey, E. Alexander, M. R. Rice, et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2018. – V. 293. – 7841–7852
10. Blunt J.W. Marine natural products / J.W. Blunt, B.R. Copp, R.A. Keyzers, et al. // Nat. Prod. Rep. – 2016. – V. 33. – P. 382–431.
11. Butler A. Marine siderophores and microbial iron mobilization / A. Butler // BioMetals. – 2005. – V. 18. – P. 369–374.
12. Challis G. L. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases / G.L. Challis // Chem. biochem. – 2005. – V. 6. – P. 601–611.
13. Chen J. Chemistry and Biology of Siderophores from Marine Microbes / J. Chen, Y. Guo, Y. Lu, et al. // Marine Drugs. – 2019. – V. 17. – P. 562–590
14. Chhibber S. Inhibiting biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* B5055 using an iron antagonizing molecule and a bacteriophage / S. Chhibber, D. Nag, S. Bansal // BMC Microbiol. – 2013. – V. 13. – P. 174–183.
15. Fujita M. Bisucaberin B, a Linear Hydroxamate Class Siderophore from the Marine Bacterium *Tenacibaculum mesophilum* / M. J. Fujita, K. Nakano, R. Sakai // Molecules. – 2013. – V. 18. – P. 3917–3926.
16. Fujita M. Cloning and Heterologous Expression of the Vibrio ferrin Biosynthetic Gene Cluster from a Marine Metagenomic Library / M. Fujita, N. Kimura, A. Sakai, Y. Ichikawa, T. Hanyu, M. Otsuka // Bioscience Biotechnology Biochemistry. – 2011. – V. 75. – 2283–2287.
17. Gaonkar T. Applications of Siderophore Producing Marine Bacteria in Bioremediation of Metals and Organic Compounds / T. Gaonkar, S. Borkar // Marine Pollution and Microbial Remediation. – 2017. – P. 177–187
18. Guan L.L. Bacterial response to siderophore and quorum-sensing chemical signals in the seawater microbial community / L.L. Guan, K. Kamino // BMC Microbiol. – 2001. – V. 1. – P. 1–11.

19. Handley M. Biogeochemical implications of the ubiquitous colonization of marine habitats and redox gradients by *Marinodacter sp.* / K. M. Handley, J. R. Lloyd // *Frontiers in Marine Science*. – 2013. – V. 4. – A. 136
20. Hayaishi O. Oxygenases / O. Hayaishi // *Encyclopedia of Biological Chemistry*. – 2013. – V. 3. – P. 178–182
21. Hider R. Chemistry and biology of siderophores / R. C. Hider, X. Kong // *The Royal Society of Chemistry*. – 2010. – V. 27. – P. 637–657.
22. Homann V. Siderophores of *Marinobacter aquaeolei*: petrobactin and its sulfonated derivatives / V. Homann, K. J. Edwards, E. A. Webb, A. Butler // *Biometals*. – 2009. – V. 22. – P. 565–571.
23. Johnstone T.C. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores / T.C. Johnstone, E.M. Nolan // *Dalton Transactions*. – 2015. – V. 44 (14). – P. 6320–6339.
24. Jones K. Ti(IV) and the Siderophore Desferrioxamine B: A Tight Complex Has Biological and Environmental Implications/ K. E. Jones, K. L. Batchler, C. Zalouk, et al. // *Inorganic Chemistry*. – 2017. – V. 53. – P. 1264–1272.
25. Kanoh K. Pseudoalterobactin A and B, new siderophores excreted by marine bacterium *Pseudoalteromonas sp.* KP20-4 / K. Kanoh, K. Kamino, G. Leleo, et al. // *The Journal of antibiotics*. – 2003. – V. 56. – P. 871–875.
26. Kem P. Fatty Acid Hydrolysis of Acyl Marinobactin Siderophores by *Marinobacter* Acylases / P. Kem, H. Naka, A. Iinishi, M. G. Haygood, A. Butler // *Biochemistry*. – 2015. – V. 54. – P. 744–752
27. Khan A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review/ A. Khan, P. Singh, A. Srivastava // *Microbiological Research*. – 2018. – V. 212. – P. 103–111.
28. Kraemer S.M. Siderophores in Plant Iron Acquisition: Geochemical Aspects / S.M. Kraemer, D. Crowley, R. Kretzschmar // *Advances in Agronomy*. – 2006. – V. 91. – P. 1–46.

29. Kramer, J., Özkaya, Ö. & Kümmerli, R. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* – 2020. – V. 18. – 152–163.
30. Krewulak K.D. Structural biology of bacterial iron uptake / K.D. Krewulak, H.J. Vogel // *Biochem. Biophys. Acta – Biomembranes.* – 2008. – V. 1778 (9). – P. 1781–1804.
31. Lee H. Synthesis and Characterization of Anguibactin To Reveal Its Competence To Function as a Thermally Stable Surrogate Siderophore for Gram-Negative Pathogen, *Acinetobacter baumannii* / H. Lee, W. Young Song, M. Kim, et al. // *Org. Lett.* – 2018. – V. 20. – P. 6476–6479.
32. Leventhal G. Why microbes secrete molecules to modify their environment: the case of iron-chelating siderophores / G. E. Leventhal, M. Ackermann, K. T. Schiess // *Interface.* – 2019. – V. 16. – P. 205–218.
33. Lin P. Incorporation of Hydroxamate Siderophore and Associated Fe into Marine Particles in Natural Seawater/ P. Lin, C. Xu, L. Sun, et al. // *Frontiers in Marine Science.* – 2020. – V. 7. – A.584628
34. Macrellis M. Collection and detection of natural iron-binding ligands from seawater / H. M. Macrellis, C. G. Trick, E. L. Rue, et al. // *Marine Chemistry.* – 2001. – V. 76. – P. 175–187
35. Miethke M. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control / M. Miethke, M.A. Marahiel // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2007. – V. 71(3). – P. 413–451.
36. Moriah S. Microbial Iron Acquisition: Marine and Terrestrial Siderophores / S. Moriah, A. Butler // *Chemical Rev.* – 2009. – V. 109. – P.4580–4595.
37. Nielsen A. Nigribactin, a Novel Siderophore from *Vibrio nigripulchritudo*, Modulates *Staphylococcus aureus* Virulence Gene Expression / A. Nielsen, M. Mansson, M. Wietz, et al. // *Marine Drugs.* – 2012. – V. 10. – P. 2584–2595.
38. Payne S. M. (1994). Detection, isolation, and characterization of siderophore methods / S. M. Payne // *Enzymology.* – 1994. – V. 235. – P. 329–344.

39. Roberts A. Iron acquisition in the marine actinomycete genus *Salinispora* is controlled by the desferrioxamine family of siderophores / A. Roberts, A. W. Schultz, RD Kersten et al. // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2012. – V. 335(2). – P. 95–103.
40. Roosenberg J.M. Studies and syntheses of siderophores, microbial iron chelators, and analogs as potential drug delivery agents / J.M. Roosenberg, Y.M. Lin, Y. Lu, M.J. Miller // *Current Medicinal Chemistry.* – 2000. – V. 7 (2). – P. 159–197.
41. Rue E. The role of organic complexation on ambient iron chemistry in the equatorial Pacific Ocean and the response of a mesoscale iron addition experiment / E. L. Rue, K. W. Bruland // *Limnology and Oceanography.* – 1997. – V. 42. – P. 901–9102.
42. Sah S. Siderophore: structural and functional characterisation – a comprehensive review / S.Sah, R. Singh // *Agriculture (Poľnohospodárstvo).* – 2015. – V. 3. – P. 97–114.
43. Saha M. Microbial siderophores and their potential applications: a review / M. Saha, S. Sarkar, B. Sarkar et al. // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2016. – V. 23. – P. 3984–3999.
44. Simões L.C. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water / L.C. Simões, M. Simões, M.J. Vieira // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 73. – P. 6192–6200.
45. Soengas R. Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O₂ / R. G. Soengas, C. Anta, et al. // *Tetrahedron Letters.* – 2006. – V. 47. – P. 7113–7116.
46. Schwyn B., Neilands J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore // *Analytical Biochemistry.* – 1987. – V. 160. – P. 47–56.