ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
Біологічний факультет
Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

ДИПЛОМНА РОБОТА
бакалавра

на тему: ***«Отримання сидерофорів, що утворюються мікроорганізмами у складі асоціацій»***

«The obtaining of siderophore formed by microorganisms in the associations»

Виконала: студентка IV курсу
денної форми навчання
Спеціальність 162 Біотехнології та
біоінженерія
Ольга ШВЕЦЬ

Науковий керівник
кандидат біологічних наук, доцент
Марія РУСАКОВА

Рецензент:
кандидат біологічних наук, доцент
кафедри біохімії
Андрій СОРОКІН

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№_____від «___» _____р.

Захищено на засіданні ЕК № _____
Протокол No_____від «___» _____р.
Оцінка _____/ _____/_____
(за національною шкалою, шкалою ECTS,бал)

Завідувач кафедри
_____ Тетяна ФІЛІПОВА
(підпис) (прізвище та ініціали)

Голова ЕК
_____ Ганна ЯМБОРКО
(підпис) (прізвище та ініціали)

Одеса - 2022

АНОТАЦІЯ

Досліджено здатність *Bacillus subtilis* МБ1 та *Bacillus subtilis* ОНУ 481, а також *Pseudomonas chlororaphis* ONU 301 та *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13225 синтезувати сидерофори під час окремого культивування та під час формування асоціацій.

Найбільш активними продуцентами сидерофорів на протязі моновидового культивування виявилися штами псевдомонад *P. chlororaphis* ONU 301 та *P. fluorescens* ATCC 13225. Клітини цих мікроорганізмів впродовж стаціонарної фази розвитку виділили найвищу кількість сполук. У випадку з полівидовим культивуванням, найбільш перспективним продуцентом сидерофорів встановлено асоціацію штамів *P. chlororaphis* ONU 301 та *B. subtilis* МБ1. Через жортскі умови, цей штам бацил має здатність до більш інтенсивної продукції вторинних екзометаболітів.

Роботу викладено на 32 сторінках, вона містить 6 таблиць та 2 рисунка. Наведено посилання на 48 джерел літератури (2 кирилицею та 46 латиницею).

Ключові слова: *сидерофори, вторинні екзометаболіти, рід Pseudomonas, рід Bacillus, біотехнологія.*

The ability of *Bacillus subtilis* MB1 and *Bacillus subtilis* ONU 481, as well as *Pseudomonas chlororaphis* ONU 301 and *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13225 to synthesize siderophores during separate cultivation and during formation of associations was studied.

Pseudomonas strains *P. chlororaphis* ONU 301 and *P. fluoresceus* ATCC 13225 were the most active producers of siderophores during monospecies cultivation. The cells of these microorganisms during the stationary phase of development isolated the highest number of compounds. In the case of multispecies cultivation, the association of *P. chlororaphis* ONU 301 and *B. subtilis* MB1 strains was set as the most promising producer of siderophores. Due to harsh conditions, this strain of bacilli has the ability to produce secondary exometabolites more intensively.

Course work is expounded on 32 pages, it contains 6 tables and 2 figures. It provides links to 48 references (2 cyrillic and 46 latinic).

Key words: *siderophores, secondary exometabolites, genus Pseudomonas, genus Bacillus, biotechnology.*

ЗМІСТ

ВСТУП

Ферум є важливим елементом для зростання майже всіх живих організмів, оскільки воно діє як каталізатор в ферментативних процесах, кисневому метаболізмі, перенесенню електронів, а також в синтезі ДНК і РНК. Цей елемент також необхідний для утворення біоплівок, оскільки він регулює рухливість поверхні і стабілізує полісахаридний матрикс. В умовах зростання з дефіцитом Феруму, гідрофобність мікробної поверхні знижується, що змінює склад поверхневих білків і призводить до обмеження утворення біоплівок.

Але в навколишньому середовищі існує проблема низької біодоступності Феруму, тому мікроорганізми розробили особливі стратегії для її вирішення, зокрема вироблення сидерофорів. Сидерофори − це речовини з низькою молекулярною масою, які хелатують метали, і продукуються мікроорганізмами та рослинами, особливо в умовах обмеження вмісту Феруму.

Отримання Феруму в клітині бактерій зазвичай регулюється Fur-генами (для регулювання поглинання заліза) під час процесу, що залежить від його концентрації [Crosa et al., 2014]. При високій концентрації даного іону сидерофори не утворюються через зв'язування білка Fur на промоторі гена, що кодує сидерофори. Коли спостерігається низька внутрішньоклітинна концентрація Феруму, конформаційна зміна білка Fur спричиняє його від'єднання від промотору гена сидерофору, відновлюючи транскрипцію гена та можливий синтез сидерофорів. Транспорт зв’язаних із іоном сидерофорів опосередковується мембранними рецепторами, білками периплазматичної мембрани та TonB-подібними транспортерами,а після цього тривалентне залізо відновлюється до двовалентної форми. Додаткові системи зв’язування Феруму включають гемофори та гем [Flannery et al, 2013].

Через значний вплив Феруму на різні сфери життя людини, активно вивчаються можливості біотехнологічного отримання сидерофорів. Сфери застосування включають сільське господарство, медицину, фармакологію,

біоремедіацію, біодеградацію та харчову промисловість. У галузях сільського господарства можна застосовувати сидерофори для посилення росту рослин, вони перешкоджають розвитку фітопатогенів. Дослідження біомедиації з використанням сидерофорів передбачають здебільшого мобілізацію важких металів та радіонуклідів, а також грунтуються на емульгуючій активності сидероформпродукуючих мікроорганізмів у забруднених нафтою середовищах. Різні варіанти застосування сидерофорів в медицині включають попередження перевантаження заліза до розробки систем доставки ліків і, нещодавно, вакцин [De Serrano, 2017].

Мета дослідження полягала у вивченні отримання сидерофорів продуцентами *Bacillus subtilis* МБ1, *Bacillus subtilis* ОНУ 481, *Pseudomonas chlororaphis* ONU 301 та *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13225 у складі асоціації та складання біотехнологічної схеми отримання екзометаболітів. Для виконання зазначеної мети даного дослідження були поставлені наступні **завдання**:

1. Визначити інтенсивність продукції сидерофорів досліджуваними штамами мікроорганізмів при моновидовому культивуванні.

2. Співставити інтенсивність накопичення таких вторинних метаболітів, як сидерофори, зі стадією розвитку культури.

3. Провести сумісне культивування досліджуваних штамів мікроорганізмів та визначити під час цього процесу кількості утворених сидерофорів.

4. Порівняти інтенсивність утворення сидерофорів з накопиченням біомаси цими мікроорганізмами у складі асоціації.

Об’єкт дослідження - синтез сидерофорів представниками родів *Bacillus* та *Pseudomonas.*

Предмет дослідження - рівень накопичення сидерофорів, нарощення біомаси клітин.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика мікробних сидерофорів

Мікроорганізми продукують широкий спектр сидерофорів (рис. 1). Більшість бактеріальних сидерофорів представляють собою катехолати (наприклад, ентеробактин), деякі − карбоксилати (наприклад, ризобактин) та гідросамати (наприклад, ферріоксамін B). Проте існують також певні типи бактеріальних сидерофорів, які містять основні функціональні групи (наприклад, піовердин) [Cornelis, 2015].

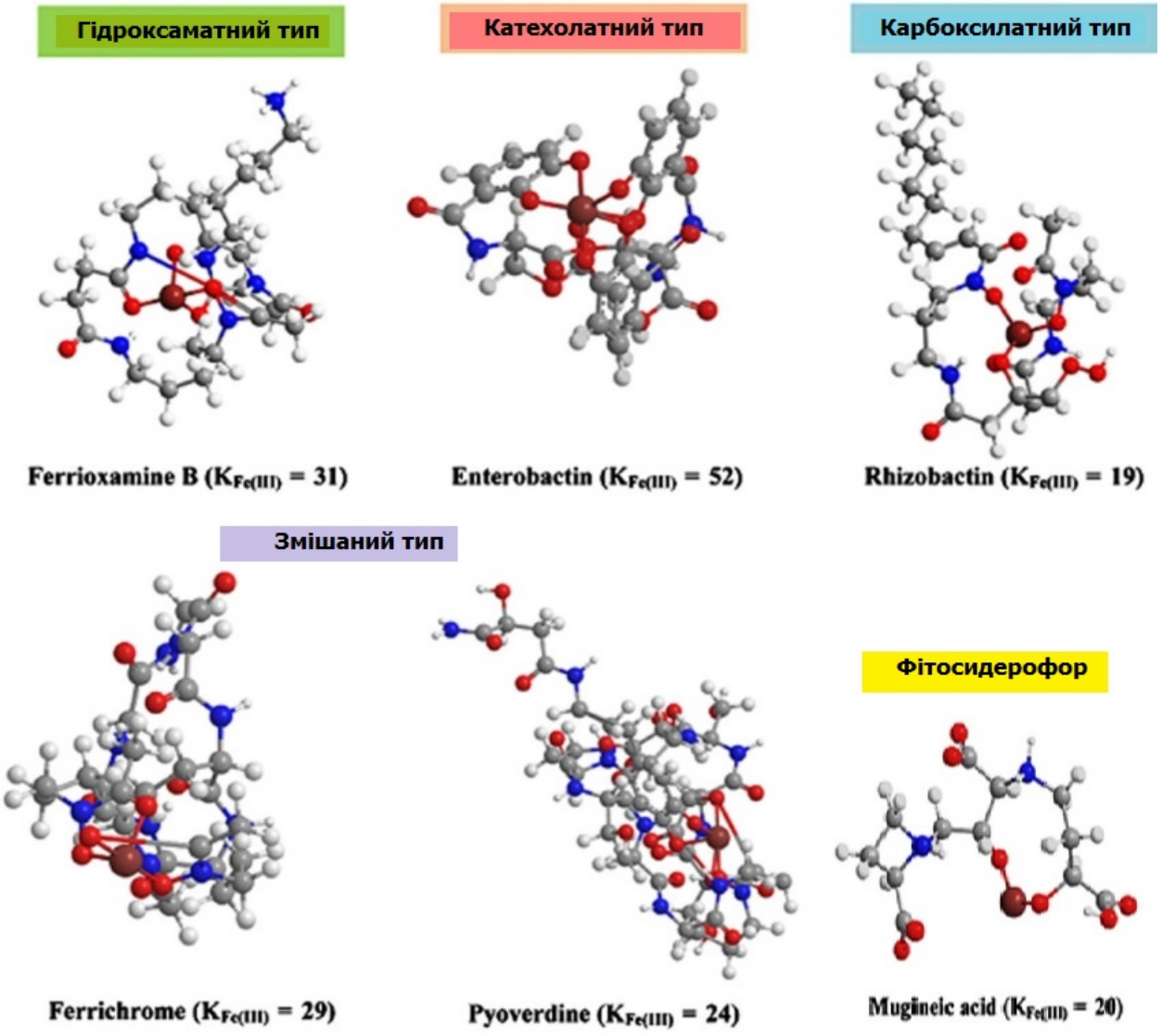

Рис. 1. Приклади мікробних та фітосидерофорів з константою стійкості кожного типу [Ahmed et al, 2014]: Ferrioxamine B − Феріоксамін B,

Enterobactin − Ентеробактин, Rhizobactin − Ризобактин, Ferrichrome − Ферихром, Pyoverdine − Піовердин, Mugineic Acid − Мугінеїнова кислота.

Одними із найбільш розповсюджених сидерофорів у грибів є гідроксамати, що належать до родини феррихромів, які розділяються на п’ять груп у залежності від бічного ланцюга самої гідроксаматної групи [Winkelmann, 2013].

Таблиця 1

Різні форми сидерофорів, що продукуються мікроорганізмами

[Hider et al., 2016]

Вид сидерофору	**Організм-продуцент**
Гідроксаматні сидерофори	
Ферихром	*Ustilago sphaerogena*
Десферріоксамін В (дефероксамін)	*Streptomyces pilosus* *Streptomyces coelicolor*
Десферріоксамін Е	*Streptomyces coelicolor*
Фузаринін С	*Fusarium roseum*
Орнібактин	*Burkholderia cepacia*
Родоторулова кислота	*Rhodotorula pilimanae*
Катехолатні сидерофори	
Ентеробактин	*Escherichia coli, бактерії родини Enterobacteriaceae*
Бацилібактин	*Bacillus subtilis, Bacillus anthracis*
Вібріобактин	*Vibrio cholerae*
Змішані сидерофори	
Азотобактин	*Azotobacter vinelandii*
Піовердин	*Pseudomonas aeruginosa*
Ієрсініябактин	*Yersinia pestis*

В основному сидерофори містять гідроксаматні і катехолатні групи, приєднані до лінійних або циклічних вуглеводневих каркасів з утворенням гексадентатної структури в комплексі з залізом. Мікроорганізми синтезують також сидерофори, що представляють собою тетрадентати, тридентати і

бідентати, які менш ефективно пов'язують іон Fe(III). Двома найбільш сильними хелаторами заліза є похідні трикатехолат-трилактона − бацилабактин і ентеробактин, у яких константи утворення комплексів з Fe (III) складають 10^{48} і 10^{49}, відповідно [Schalk, 2014].

Сидерофори характеризуються більш високою спорідненістю до Fe(III), ніж до Fe(II), а також здатні зв'язувати інші метали. Наприклад, шизокинін, крім участі в поглинанні заліза, здатний утворювати комплекс з міддю і, таким чином, відіграє важливу роль у зниженні її цитотоксичності [Haselwandter, 2012].

Постійно виявляють нові сидерофори, багато з яких є структурними аналогами раніше вивчених. Наприклад, відомо більше 60 аналогів піовердину, 21 аналог десферрихрому, 21 аналог ентеробактину і 20 аналогів десферіоксаміну [Raymond, 2013].

Для підвищення своєї конкурентоспроможності багато мікроорганізмів продукують декілька сидерофорів і / або можуть використовувати чужорідні сидерофори (ксеносидерофори), присутні в навколишньому середовищі (у воді та грунті). Наприклад, умовно патогенна для людини грамнегативна бактерія *P. aeruginosa* продукує два основних сидерофори, піовердін і піохелін, і може ще використовувати, принаймні, п'ять ксеносидерофорів: FOB (ферріоксамін B), Ферихром (FCH), цепабактин, ентеробактин і Fe-дицитрат [Сандовал, 2019].

Сидерофори утворюють міцні комплексні сполуки з Fe^{3+} за рахунок електронодонорних атомів, які здатні витісняти молекули води з внутрішньої сфери аквакомплексу. За умови, що одна молекула сидерофору надає шість електронодонорних атомів, необхідних для комплексоутворення, утворюється октаедричний комплекс складу Fe-сидерофор. У разі, якщо одна молекула сидерофору містить менше шести електронодонорних атомів, що беруть участь в комплексоутворенні, утворюються комплекси іншого складу, наприклад, для родоторулової кислоти (*Rhodotorula mucilaginosa*) − Fe_2L_3,

піохеліна (*P. aeruginos*a) − FeL і FeL_2, цепабактина (*B. cepacia*) − FeL_3 [Rajkumar, 2018].

Комплекси Fe^{3+} з сидерофорами відрізняються високою термодинамічною стійкістю, не дивлячись на відсутність стабілізації з боку поля лігандів, так як атоми кисню є жорсткими лугами Льюїса. Крім іонів Fe^{3+} сидерофори можуть пов'язувати в менш міцні комплекси інші катіони металів, особливо тривалентні катіони Алюмінію. Однак Галій здатний утворювати більш міцні комплекси з сидерофорами, ніж Ферум. На прикладі *P. aeruginosa* показано, що внесення в середовище Галію блокує сидерофори і популяція бактерій зменшує свою вірулентність і ростову активність [Krywulak, 2018].

Синтез певного сидерофору, швидше за все, залежить від умов навколишнього середовища. Здатність сидерофору утворювати міцні комплекси з іонами Fe^{3+} сильно залежить від pH середовища, в якій відбувається комплексоутворення. Протони водню можуть конкурувати з іонами Fe^{3+} за електронодонорні атоми, тому у визначенні справжніх констант стійкості комплексів сидерофори-Fe^{3+} необхідно враховувати pH середовища [Леонов и др., 2016].

1.2. Особливості транспорту Феруму різними мікроорганізмами з використанням сидерофорів

Мікроорганізми використовують різні системи транспорту Fe, до яких залучено сидерофори. Транспортні системи Феруму бактерій відрізняються між грампозитивними та грамнегативними бактеріями [Haas, 2013].

Грамнегативні бактерії, зокрема *E. coli*, мають TonB-залежні рецептори зовнішніх мембран, які розподіляють комплекси Fe(III)-сидерофора на поверхні клітин. Як тільки відбувається зв'язування з рецепторами зовнішніх мембран, комплекс перетинає мембрану через енергозалежну систему, що складається з білка рецептора зовнішньої мембрани, периплазматично зв'язаних та транспортних білків внутрішніх мембран. Після цього

Fe(III)-сидерофор, який пов'язаний з високоафінним периплазматичним зв’язаним білком, що забезпечує комплекс із цитоплазматичною мембраною, вивільняється в периплазматичному просторі [Noinaj et al., 2015]. Потім комплекс транспортується через цитоплазматичну мембрану за допомогою транспортної системи з АТФ-зв'язуючою касетою (ABC), дозволяючи йому досягти цитоплазми. Ферум звільнюється з комплекса Fe(III) − сидерофор за допомогою відновлення Fe(III).

У грампозитивних бактерій (наприклад, *Bacillus sp.*), у яких відсутня внутрішня мембрана, рецептори зовнішньої мембрани повністю відсутні. Наступні, комплекси Fe (III) з сидерофором пов'язані з периплазматичними білками, які укріплені на клітинній мембрані із-за відсутності периплазматичного простору [Fukushima et al., 2013]. Захищені комплекси Fe (III) з сидерофором далі транспортуються за допомогою АТФ-залежних транспортерів у цитоплазму відповідно до транспортної системи ABC таким чином, як грамнегативні бактерії [Braun et al, 2015].

У бактерій Fe^{2+}-залежні репресори зв'язуються з генами, що беруть участь у синтезі сидерофорів, при високих концентраціях внутрішньоклітинного заліза. У відповідь на обмеження вмісту заліза в навколишньому середовищі гени, що беруть участь у продукції і поглинанні сидерофорів мікробами, дерепресуються, що призводить до виробництва сидерофорів і відповідних білків захоплення. При низьких концентраціях Fe^{2+} відділяється від репресора, який, в свою чергу, відділяється від ДНК, що призводить до транскрипції генів. У грамнегативних і АТ-збагачених грампозитивних бактерій це зазвичай регулюється репресором Fur (регулятор захоплення заліза), у той час як у грампозитивних бактерій з високим вмістом GC (наприклад, актинобактерій) це DtxR (дифтерійний токсин-репресор), названий так через те, що виробництво *Corynebacterium*- токсину також регулюються за допомогою цієї системи [Miethke et al., 2015]. Після цього відбувається екскреція сидерофорів в позаклітинне середовище, де сидерофори вивільняють Ферум [Hider et al, 2016]. Потім сидерофори

розпізнаються клітинно-специфічними рецепторами на зовнішній мембрані клітини.

У грамнегативних бактерій вони транспортуються в периплазму через TonB-залежні рецептори і переносяться в цитоплазму транспортерами ABC [Roosenberg et al., 2012].

Таким чином, еволюція сидерофорів досі є мало вивченою, але конкуренція за Ферум є настільки важливою, що розвиток сидерофорів та їх транспортних систем впливали один на одного в тому сенсі, що коли з'явилися нові структурні сидерофори – це обумовило подальше їх використання іншими конкуруючими мікроорганізмами [Winkelmann, 2013].

1.3. Значення сидерофорів для організмів

Відомо, що мікробні сидерофори забезпечують рослини Ферумом, який сприяє посиленню їх росту за умов низької біодоступність цього елементу [Rivault et al., 2017], але точний механізм цього процесу є досить невідомим. Було запропоновано два можливі шляхи, за допомогою яких рослини можуть отримувати Fe, що зв’язано з мікробними сидерофорами:

(1) мікробні сидерофори з високим окислювально-відновним потенціалом можуть бути відновлені для транспорта Fe(II) у рослинну клітину. За цим механізмом було висунуто гіпотезу про те, що мікробні Fe(III)-сидефори транспортуються до апопласту кореня рослини, де може відбуватися відновлення сидерофорів. Отже, Fe(II) потрапляє в апопласт, що призводить до підвищення концентрації Феруму в корені [Wang, 2015];

(2) мікробні сидерофори можуть хелатувати Ферум у ґрунті, а потім здійснювати обмін лігандами з фітосидерофорами [Masalha et al., 2010]. Цей механізм залежить від кількох параметрів, тобто від констант стійкості та концентрацій мікробних та фітосидерофорів, а також від pH та окислювально-відновних умов всередині коренів [Cohen et al., 2010].

Різні види псевдомонад можуть поліпшити ріст рослин, виробляючи сидерофори (піовердини) або захищаючи їх від патогенів, і, отже, ця група

бактерій була класифікована як бактерії, що сприяють росту рослин [Gamalero et al., 2018]. Також інші бактерії, такі як *Azadirachta indica*, які виробляють ферріоксаміни, можуть зробити свій внесок у Fe-живлення рослини та сприяти її росту [Verma et al., 2016]. Існують дослідження грибів *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* та *Trichoderma harzianum*, що сприяють росту рослин, і сидерофорів, що ними синтезуються, щодо збільшення довжини пагонів та коренів нуту (*Cicer arietinum*) [Yadav et al., 2015]. Виявлено, що такий сидерофор пседомонад, як піовердин, попереджає розвиток зів'янення картоплі, яке спричиняється *Fusarium oxysporum*. Крім того, піовердин бере участь у контролі розвитку *Gaeumannomyces graminis*, що спричиняє затримку росту пшениці та ячменю. Спостерігали також, що піовердини пригнічують розвиток деяких патогенів арахісу та кукурудзи [Pal et al., 2012]. Сидерофори, вироблені *Bacillus sp.*, здатні попереджати та суттєво гальмувати *F. oxysporum*, який є збудником фузаріозного зів'янення перцю [Yu et al., 2016]. Також сидерофори, вироблені *Acalypha indica* мали високу спорідненість до хелатованого Fe(III) у ґрунті і тим самим негативно впливали на ріст кількох грибкових патогенів [Verma et al., 2016].

Також сидерофори можна використовувати для лікування різних захворювань і допомагати розробляти діагностичні тести для поліпшення здоров'я людини.

Одним з найбільш вивченим аспектом застосування сидерофорів є лікування «перевантаження» Ферумом під час переливання крові через негеморагічні стани. Десферіоксамін В, сидерофор, що продукується бактерією *S. pilosus*, застосовувався в різних випадках отруєння залізом або перевантаження, підтверджуючи його біотехнологічний потенціал [Kobayakawa et al., 2015]. Деферіоксамін хелатує як Fe^{3+}, так і Fe^{2+}. Було отримано модифікацію структури десферіоксаміну, виходячи з того, що молекула з низькою молекулярною масою може краще функціонувати як фармакофор. Структурна модифікація спричинила диференціацію

ліпофільності молекули порівняно з батьківською молекулою-хелатором [Cohen et al., 2010].

Ще одним застосуванням сидерофорів є антимікробні кон'югати. Сидерофор, що представляє інтерес, приєднується до антибіотика і використовується як «троянський кінь», щоб служити агентом для доставки ліків. Цей підхід сприяє транспортуванню антибіотиків через мембрану за допомогою сидерофорних рецепторів. Розроблено два кон'югати артробактин-карбацефему та оброблено кишкову паличку. На ріст бактерії впливали кон'югати сидерофора та антибіотика, і ефект посилювався, якщо до середовищ для росту додавали хелатор заліза.

Розроблено штучні сидерофори та вивчено їх антимікробні властивості при кон'югуванні з карбацефалоспорином. При одночасному лікуванні кон'югатами гідроксамічних і катехолсидерофорів знижується ріст бактерій. Іншими цікавими молекулами є сидероміцини, пов'язані або з Lorabid, або з ципрофлоксацином [Wencewicz et al., 2013]. Перший кон'югат атакує периплазму, а пізніше клітинну стінку. Сидероміцини ефективно пригнічують ріст *Staphylococcus aureus*. Іншим вивченим комплексом кон'югатів сидерофору був піохелін-норфлоксацин [Rivault et al., 2017]. Аналоги сидерофору були синтезовані та пов'язані з норфлоксацином (антибіотиком). Протимікробну активність перевіряли на псевдомонадах, і два з чотирьох кон'югатів були ефективними проти збудника. Іншим прикладом аналогів сидерофора є кон'югат ванхробактиннорфлоксацин, який виявляв антимікробну активність проти *Vibrio anguillarum* та його мутантів [Souto et al., 2013].

1.4. Біотехнологія отримання сидерофорів та фактори, що впливають на їх синтез

Одним з перших опублікованих досліджень було отримання сидерофорів з використанням *Azospirillum lipoferu*. Цей мікроорганізм асоціюється з різними ризосферами рослин, сприяючи фіксації Нітрогену.

Щоб визначити протимікробні властивості сидерофорів, екстракти тестували щодо різних видів бактерій та грибів. Спостерігали бактерицидну дію щодо видів родів *Rhizobium*, *Azotobacte*r, *Escherichia*, *Serratia*, *Staphylococcus* та *Bacillus*. Фунгіцидна активність була виявлена щодо родів *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Aspergillus* та *Penicillium* [De la Rosa-Garcia et al., 2017].

Встановлено, що деякі мікроорганізми, такі як ціанобактерії, як з наземного, так і з прісноводного середовища, виробляють сидерофори з потенційним біотехнологічним застосуванням [Silva-Stenico et al., 2019]. Дослідження показало, як екстракти з ізолятів ціанобактерій, що продукують сидерофори (аеругінозини), мають протимікробні властивості. Також ці мікроорганізми виробляли інші токсини та протимікробні агенти, включаючи мікроцистин та ціанопептолін. Антимікробні властивості були описані також у сидерофорів *Stenotrophomonas maltophilia* [Minkwitz et al., 2011]. Цей мікроорганізм став дуже важливим як для біотехнологічних цілей, а також як той збудник, для якого зросла роль у внутрішньолікарняних інфекціях.

Хоча біодоступність Fe сильно пов'язана з pH, вироблення сидерофору різними мікроорганізмами контролює pH-залежність дефіциту Fe. Наприклад, кислі ґрунти багаті на гідроксаматні сидерофори, що виробляються головним чином грибами та стрептоміцесами, і відображає в оптимальній стабільності їх залізних комплексів при низькому pH. На відміну від нейтральних до лужних ґрунтів підтримується виробництво як гідроксамату, так і катехолатних сидерофорів. Особливо для катехолатних сидерофорів така ситуація пов’язана з тим, що катехолати розроблені для оптимального зв’язування Fe в нейтральних умовах, з тенденцією втрачати Fe^{3+} при низьких pH [Winkelmann, 2013]. У роду *Bacillus* утворення сидерофоріндикативного ореолу на агарових пластинах було більшим між pH 7,0-9,0, ніж при нижчому (5,0) та вищому (11,0) pH [Hu, 2011]. Таким чином, вплив pH на продукцію сидерофору залежить як від виду, так і від структури. Наприклад, було показано, що гриб *Hymenoscyphus ericae* продукує гідроксаматні сидерофори при діапазоні pH 3,5 і 5,5, з оптимальним продукуванням 4,5. Подібним

чином, штам *E. coli* виробляє катехолатний сидерофор, аеробактин, максимально при pH 5,6. На відміну від цього, виробництво двох інших катехолатних сидерофорів (сальмохеліну та ієрсініабактину) цим штамом можна досягти максимально при pH 7,0 і вище. На виробництво сидерофору значною мірою впливає діапазон pH ніші для даного мікроорганізму, який також визначає окисно-відновний стан навколишнього Fe.

Наявність інших металів, крім Fe, може вплинути на швидкість синтезу сидерофору; виробництво може регулюватися вгору або вниз, залежно від металу та мікроорганізму. Ni в цілому стимулював продукцію сидерофорів на основі порівняння відносних значень кількості між обробленими та необробленими клітинами. Відповідно до впливу іонів металів на продукцію сидерофорів, нещодавні дослідження взаємодії наноматеріалів та мікробів продемонстрували, що наночастинки металу впливають на вироблення сидерофорів у флуоресцентних псевдомонадах. У *Pseudomonas chlororaphis* спостерігали, що наночастинки CuO знижували рівень периплазматичних та секретуючих сидерофорів, погіршуючи експресію генів, що кодують білки, які беруть участь у дозріванні піовердину в периплазмі, та експорт зрілого продукту в навколишнє середовище. На відміну від цього, наночастинки ZnO регулюють виробництво сидерофору. Іони Zn, що постійно виділяються з наночастинок ZnO, можуть пояснити регуляцію сидерофорів за допомогою кривої росту бактерій ZnO у відсутності Ni, що приблизно відповідає кінетиці виробництва сидерофора [Dimkpa et al., 2017].

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Досліджувані мікроорганізми та умови їх культивування

Дослідження щодо визначення продукції сидорофорів при сумісному культивуванні досліджуваних мікроорганізмів було здійснено на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології та в Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

В експерименті були використані штами бактерій, отримані з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова: *Bacillus subtilis* МБ1, що виділено з гідробіонтів Чорного моря, та *Bacillus subtilis* ОНУ 481, а також *Pseudomonas chlororaphis* ONU 301 та *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13225.

Для відновлення штамів з колекції, їх підтримки при поверхневому культивуванні було використано наступні поживні середовища:

- для бацил − м’ясо-пептонний агар (МПА), г/мл: [Cappuccino et al., 2012]
- для псевдомонад − агар Кінг В, г/мл: [Cappuccino et al., 2012].

Також в роботі було використано рідке поживне середовище Гіса для сумісного культивування мікроорганізмів під час дослідження продукції ними сидерофорів [Madigan et al., 2016].

Поживні середовища було простерилізовано під тиском при 120 ºС впродовж 30 хвилин. Попередня стерилізація скляного посуду та інструментів здійснювалась у сухожаровій шафі впродовж години при температурі 180 ºС.

Досліджувані мікроорганізми попередньо культивувались на відповідних щільних середовищах в термостаті при 25 ºС впродовж доби. Після цього на основі цих культур готували чотири варіанти суспензій клітин відповідних штамів на основі стерильного фізрозчину, визначаючи оптичну густину з використанням стандарту за МакФарландом: $1{,}5 \cdot 10^8$ КУО/мл [Ryan et al., 2015].

Із кожного зразка суспензії відбирали по 1,0 мл і вносили у 50 мл рідкого середовища Гіса, де проводився основний етап дослідження − сумісне культивування мікроорганізмів з метою накопичення ними сидерофорів. Тривалість інкубації становила 5 діб, при температурі 25 ºС.

2.2. Варіанти експерименту, що було проведено для визначення здатності щодо продукції сидерофорів досліджуваними мікроорганізмами

В роботі було проведено визначення здатності досліджуваних мікроорганізмів синтезувати сидерофори у наступних варіантах культивування (табл. 2).

Таблиця 2

Варіанти культивування мікроорганізмів, яке було проведено для визначення їх здатності утворювати сидерофори

Досліджувані мікроорганізми	–	*P. chlororaphis* ONU 301 (P_c)	*P. fluorescens* ATCC 13225 (P_f)
–		P_c	P_f
B. subtilis МБ1 ($B_{МБ1}$)	$B_{МБ1}$	$B_{МБ1} + P_c$	$B_{МБ1} + P_f$
B. subtilis ОНУ 481 (B_{481})	B_{481}	$B_{481} + P_c$	$B_{481} + P_f$

У кожному з представлених випадків, як окремого, так й сумісного культивування, проводили, перш за все, визначення кількості клітин мікроорганізмів спектрофотометричним методом, відбираючи проби по 0,5 мл [Ninfa et al., 2013]. Відразу після взяття проб проводили їх розділ (надосадова рідина/осад), центрифугуючи впродовж 20 хвилин при 10000 g та температурі 14 °С.

Після центрифугування надосадову рідину зберігали для визначення сидерофорів, які було утворено досліджуваними мікроорганізмами. Проте, осаджену масу клітин ресуспендували в фізіологічному розчині, з подальшим

вимірюванням оптичної щільності при довжині хвилі 600 нм [Ghosh et al., 2015]. Показники, які було отримано після вимірювання, переводили у вміст КУО/мл поживного середовища як показник накопичення мікробної біомаси за допомогою калібрувальної кривої, що відповідає цим мікроорганізмам.

2.3. Визначення сидерофорів, які утворювались досліджуваними мікроорганізмами

Бактеріальні штами перевіряли на здатність продукувати сидерофори за допомогою універсального CAS тесту згідно Schwyn and Neilands [1987]. Перед початком експерименту, скляний посуд ополіскували з 3 моль/л соляною кислотою (HCl) для видалення заліза, а потім промивали деіонізованій воді згідно Cabaj and Kosakowska [2007]. Для оцінки продукції сидерофорів бактеріальними штамами використовували як якісні, так і кількісні методи. Для обох методів реагент CAS готували згідно Schwyn та Neilands [1987]. Коротко, 121 мг CAS розчиняли у 100 мл дистильованої води та 20 мл 1 мМ розчину хлориду заліза ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), приготованого у 10 мМ HCl. Цей розчин додавали до 20 мл броміду розчину гексадецилтриметиламонію (ГДТМА) при перемішуванні. Розчин ГДТМА готували шляхом змішування 729 мг ГДТМА у 400 мл дистильованої води. Розчин CAS-ГДТМА стерилізували перед подальшим використанням.

Модифікований метод оцінки продукції сидерофорів здійснювали з використанням мікропланшета титрування. Супернатант отримували з 0,5 мл інокульованого (5 мкл інокуляту, що містило 10^8 КУО/мл) бульйону. Супернатант (100 мкл) кожної бактеріальної культури додавали в окремі лунки мікропланшета з подальшим додаванням 100 мкл реагенту CAS. Після інкубації оптичну густину кожного зразка (поміщеного в лунки мікропланшета) реєстрували при 630 нм за допомогою імунологічногоспектофотометру. Було взято чотири повтори для кожного штаму в 96-лунковому планшеті, і сидерофори були оцінені у відсотках

сидерофорних одиниць (psu), які були розраховані відповідно до наступної формули [Payne, 2005]:

Виробництво сидерофорів визначалось за формулою:

$$(A_r - A_s) \times 100 A_r,$$

де A_r − контрольне значення оптичної густини (розчин CAS та незасіяний бульйон), а A_s − оптична густина зразка (розчин CAS та безклітинний супернатант зразка).

Для кожного варіанту досліджуваних штамів було зроблено 5 повторів.

2.4. Експериментальна схема біотехнологічного отримання активних екзометаболіттів з використанням досліджуваних штамів бацил як продуцентів

Для отримання сидерофорів, що синтезуються досліджуваними мікроорганізмами, було складено схему, представлену на рисунку 2.

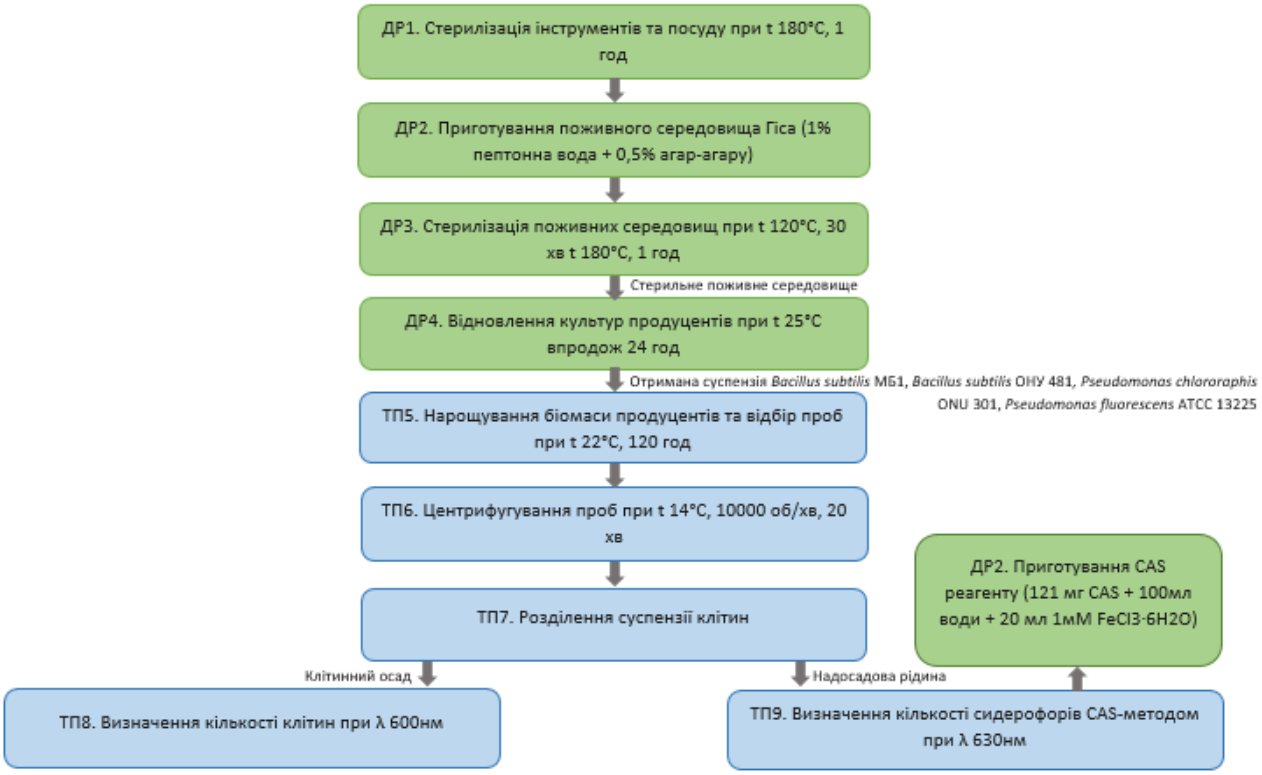

Рис. 2. Біотехнологічна схема отримання сидерофорів, що утворюються мікроорганізмами у складі асоціацій.

Кожний етап дослідження відповідав стадії експерименту, який було проведено з метою отримання мікробних сидерофорів.

2.5. Використане у дослідженні обладнання

В процесі роботи по визначенню антибіотичної активності екзометаболітів бацил було використано наступне лабораторне обладнання:

1. для зберігання культур продуцентів, тест-штамів та супернатанту - холодильник «STINOL» STS167AA(UA) (Indesit International, РФ);
2. для приготування поживного середовища - ваги лабораторні механічні ВЛР-200г 2 клас N90 (ЛенВес, РФ), плитка електрична «Wimpex» WX-100A-HP (Wimpex, КНДР);
3. для стерилізації поживного середовища - автоклав (стерилізатор паровий) ТК-100-3М (Тюмень-Медик, РФ);
4. для стерилізації лабораторного посуду та інструментів - сухожарова шафа ГП-10 (Тюмень, РФ);
5. для мікробіологічних маніпуляції (пересіви, проведення тесту методом лунок) - витяжна хімічна шафа, оснащена бактерицидною лампою (лінійною ртутною лампою низького тиску Philips TUV 30W/G30 T8 G13, Philips, Нідерланди);
6. для відновлення культури з колекції та поверхневого культивування мікроорганізмів – термостат ТС-80М-2 (Himlabpribor, Узбекистан), холодильник «STINOL» STS167AA(UA) (Indesit International, РФ);
7. для глибинного культивування мікроорганізмів – гойдалка «INNOVA 43» (New Brunswick Scientific, США);
8. для процесів обробки проб суспензій для отримання надосадової рідини та клітинного осаду, що досліджуються – центрифуга рефрижераторна «Centrifuge 5417 R» (Eppendorf, Німеччина), центрифуга для мікропробірок «Eppendorf MiniSpin» (Eppendorf, Німеччина), апарат для струшування тип АВ-10П (ВетКом, РФ) спектрофотометр «μQuant» (BioTek Instruments, США).

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Характеристика продукції сидерофорів під час окремого культивування досліджуваних мікроорганізмів

Сидерофори є найбільшим класом відомих сполук, які можуть зв'язувати, транспортувати або переміщати Fe. Вони продукуються аеробними та факультативними мікроорганізмами у кисневому середовищі в умовах низького вмісту заліза для вилучення заліза з нерозчинних мінералів. Розчинність Fe(III) збільшується за рахунок утворення комплексів із сидерофорами [Kurth, 2016].

В роботі було визначено інтенсивність продукції сидерофорів досліджуваними штамами мікроорганізмів. При цьому на першому етапі експерименту це було зроблено при моновидовому культивуванні бактерій (табл. 3).

Таблиця 3

Кількість сидерофорів, що утворювались впродовж моновидового культивування досліджуваних мікроорганізмів*

Мікроорганізм	Термін культивування, доба					
	0	1	2	3	4	5
P_c	0,017	0,028	0,036	0,081	0,173	0,188
P_f	0,021	0,030	0,061	0,072	0,168	0,170
$B_{МБ1}$	0,042	0,043	0,050	0,055	0,118	0,107
B_{481}	0,035	0,049	0,054	0,061	0,098	0,121

Примітка: * − дані представлені значень кількості клітин у супензії, х10^8 КУО/мл; P_c − *P. chlororaphis* ONU 301; P_f − *P. fluorescens* ATCC 13225; $B_{МБ1}$ − *B. subtilis* МБ1; B_{481} − *B. subtilis* ОНУ 481.

Як видно із представлених результатів, найбільш активними продуцентами сидерофорів виявились штами псевдомонад. Так, для *P. chlororaphis* ONU 301 на п’яту добу культивування відповідне значення дорівнювало $0{,}188 \cdot 10^8$ КУО/мл. У той час, як для *P. fluoresceus* ATCC 13225

ця величина досягла $0{,}170 \cdot 10^8$ КУО/мл. Що стосується штамів бацил, то для них були зафіксовані на аналогічному терміні розвитку менші значення: практично удвічі менші за попередні. При цьому, найменьш інтенсивне вироблення сидерофорів здійснювалось штамом *B. subtilis* МБ1.

Паралельно з визначенням сидерофорів, які утворювались досліджуваними мікроорганізмами, у відповідні проміжки часу фіксувалась кількість клітин у досліджуваних суспензіях. Це було зроблено для того, щоб співставити інтенсивність накопичення таких вторинних метаболітів, як сидерофори, зі стадією розвитку культури.

Відомо, що більшість вторинних метаболітів утворюються мікроорганізмами впродовж стаціонарної фази росту культури. Це обумовлено тим, що бактерії досягають максимальної концентрації, тобто максимальної кількості життєздатних особин у популяції. Метаболізм продовжується і починається виділення вторинних метаболітів. Саме це є метою, так як вони можуть використовуватися для отримання цінних продуктів і препаратів [Zwietering et al., 2004].

Результати щодо накопичення біомаси досліджуваними мікроорганізмами представлено у таблиці 4.

Таблиця 4

Накопичення біомаси досліджуваними штамами мікроорганізмів впродовж моновидного культивування*

Мікроорганізм	Термін культивування, доба					
	0	1	2	3	4	5
P_c	0,15	5,1	6,4	9,9	12,3	12,4
P_f	0,15	4,7	7,3	8,6	11,9	12,5
$B_{МБ1}$	0,15	6,3	11,2	12,4	11,9	11,4
B_{481}	0,15	6,0	11,8	13,9	14,4	14,0

Примітка: * − дані представлені значень кількості клітин у супензії, х10^8 КУО/мл; P_c − *P. chlororaphis* ONU 301; P_f − *P. fluorescens* ATCC 13225; $B_{МБ1}$ − *B. subtilis* МБ1; B_{481} − *B. subtilis* ОНУ 481.

Порівнюючи отримані результати, можна визначити, що досліджувані мікроорганізми досить швидко адаптувались до використаного поживного середовища. Вже за першу добу культивування відбулось збільшення біомаси клітин: від приблизно 3 разів у випадку псевдомонад до 4 разів – для бацил.

Наступні терміни культивування також характеризувались підвищенням кількості клітин досліджуваних мікроорганізмів. При цьому, цей процес виявився більш повільним для представників роду *Pseudomonas*. Так, впродовж другої доби показник зростання біомаси для цих штамів досягав лише 1,5-1,6. У той час, як для бацил було зафіксовано зростання майже удвічі за відповідний строк.

Продовження терміну культивування призвело до суттєвих змін у процесі зростання досліджуваних мікроорганізмів. У цьому випадку, навпаки, штами бацил виявили менший приріст, ніж псевдомонади.

Більш пізні строки експерименту, зокрема третя-четверта доба, дозволили зафіксувати наступні тенденції. Для штамів *P. chlororaphis* та *P. fluoresceus* значення показника приросту біомаси зберігалось на попередньому рівні. Проте, що стосується штамів *B. subtilis*, то кількість клітин у суспензії майже не змінилась.

Спостерігаючи за ростом мікроорганізмів впродовж наступного періода, було визначено припинення поділу їх клітин.

Отже, виходячи з отриманних даних, можна зробити висновок, що початок стаціонарної фази росту цих мікроорганізмів припадає на:

- у випадку псевдомонад, на четверту-п’яту добу;
- у випадку бацил, на другу-третю добу.

Враховуючи інтенсивність синтезу досліджуваними штамами сидерофорів, можна визначити, що початок цього процесу співпадає з початком стаціонарної фази. У той час, як для досліджуваних представників

роду *Baccilus* був зафіксований «зсув»: стаціонарна фаза почалася раніше, ніж відбулося помітне зростання продукції сидерофорів.

Очевидно, це може бути обумовлено тим, що стаціонарна фаза для спороутворюючих мікроорганізмів характеризується перш за все формування саме спор, як форми спокою та виживання в умовах виснаження поживних речовин під час культивування. Синтез сидерофорів у цьому випадку є менш «привабливим» механізмом захисту від несприятливих умов існування. Тому їх продукція не є першочерговим процесом для представників роду *Bacillus* [Christie et al., 2020].

3.2 Утворення сидерофорів мікроорганізмами під час формування асоціації

Існування мікроорганізмів in vivo в основному відбувається не у вигляді монокультур, але у складі полівидових асоціацій. Це призводить до підвищення антагоністичних взаємовідносин між учасниками угрупувань, що сприяє інтенсифікаії процесу утворення вторинних екзометаболітів з протимікробними властивостями.

В роботі було проведено сумісне культивування досліджуваних штамів мікроорганізмів та визначення під час цього процесу кількості утворених сидерофорів. Отримані результати цього експерименту представлено в таблиці 5.

Таблиця 5

Кількість сидерофорів, що утворювались при сумісному культивуванні досліджуваних мікроорганізмів*

Варіант культивування	Термін культивування, доба					
	0	1	2	3	4	5
$B_{МБ1} + P_c$	0,025	0,036	0,098	0,148	0,193	0,211
$B_{МБ1} + P_f$	0,018	0,052	0,097	0,123	0,186	0,202
$B_{481} + P_f$	0,031	0,027	0,061	0,092	0,105	0,097

$B_{481} + P_c$	0,025	0,039	0,078	0,103	0,136	0,128

Примітка: * − дані представлені на $1*10^8$ КУО/мл; P_c - *P. chlororaphis* ONU 301; P_f - *P. fluorescens* ATCC 13225; $B_{МБ1}$ -*B. subtilis* МБ1; B_{481} - *B. subtilis* ОНУ 481.

На даному етапі було встановлено, що сумісне культивування досліджуваних мікроорганізмів призводить до змін у процесі синтезу цих сполук. Так, перш за все, змінились строки, впродовж яких було зафіксоване суттєве підвищення кількості сидерофорів у поживному середовищі. Максимальне збільшення відповідного показника спостерігалось на другу добу у порівнянні з першою. Досліджувані асоціації мікроорганізмів у цьому випадку можна розташувати наступним чином:

$B_{МБ1} + P_c \geq B_{МБ1} + P_f \geq B_{481} + P_c \geq B_{481} + P_f$.

Отже, асоціація, до складу якої входив штам *P. chlororaphis* ONU 301, виявилась більш активним продуцентом сидерофорів, ніж угрупування з *P. fluoresceus* ATCC 13225.

Наступні терміни культивування характеризувались подальшим збільшенням сидерофорів у поживному середовищі. Більш інтенсивно цей процес спостерігався для асоціацій будь-якого зі штамів псевдомонад з *B. subtilis* МБ1. Очевидно, цей штам бацил має здатність або до більш інтенсивної продукції вторинних екзометаболітів, або до більш широкого їх спектру. Причиною цього може бути більш жорсткі умови існування, а саме морська вода, що призводить до більш вираженої здатності до антагоністичних проявів [Yu et al., 2016].

Порівнюючи інтенсивність утворення сидерофорів з накопиченням біомаси цими мікроорганізмами (табл. 6), можна встановити, що сумісне культивування досить сильно впливало на їх розвиток.

Таблиця 6

Накопичення біомаси досліджуваними штамами мікроорганізмів впродовж сумісного культивування*

Варіант культивування	Термін культивування, доба					
	0	1	2	3	4	5
$B_{МБ1} + P_c$	0,025	0,068	0,124	0,232	0,217	0,200
$B_{МБ1} + P_f$	0,031	0,071	0,116	0,197	0,206	0,191
$B_{481} + P_f$	0,028	0,069	0,074	0,092	0,081	0,087
$B_{481} + P_c$	0,026	0,058	0,065	0,088	0,093	0,101

Примітка: * − дані представлені у вигляді оптичної щільності; P_c - *P. chlororaphis* ONU 301; P_f - *P. fluorescens* ATCC 13225; $B_{МБ1}$ -*B. subtilis* МБ1; B_{481} - *B. subtilis* ОНУ 481.

Так, спостерігалось більш інтенсивне накопичення біомаси для асоціацій, склад яких віподвідав *B. subtilis* МБ1 та *P. fluorescens* ATCC 13225 або *P. chlororaphis* ONU 301. З часом, оптична густина відповідних суспензій збільшувалась, досягаючи максимальних значень на третю добу культивування. Подовження терміну експерименту характеризувалось, навпаки, припиненням росту клітин.

Для асоціацій B_{481} та досліджуваних штамів псевдомонад було зафіксовано меньш інтенсивне накопичення біомаси. Також, починаючи з другої доби, спостерігалось взагалі гальмування розвитку змішаної культури: показники оптичної густини практично не змінювались.

Отже, очевидно, у першому випадку для асоціацій штамів B_{481} з будь-якими із штамів псевдомонад відбувалась взаємодія між мікроорганізмами, але її форма була близькою до нейтральної. У той же час, як для іншого варіанту асоціацій, можливо, відбувався розвиток антагоністичних взаємовідносин. Це визначило зупинення зростання цих мікроорганізмів, тобто не відбувалось накопичення у такому разі біомаси: оптична густина, починаючи з другої доби залишалась незмінною [Kapali et al., 2016].

ВИСНОВКИ

1. Впродовж моновидового культивування найбільш активними продуцентами сидерофорів виявились штами псевдомонад *P. chlororaphis* ONU 301 та *P. fluoresceus* ATCC 13225.

2. Накопичення біомаси протягом моновидного культивування у бацил було більш швидким у порівнянні з псевдомонадами.

3. При сумісному культивуванні досліджуваних мікроорганізмів, асоціація штамів *P. chlororaphis* ONU 301 та з *B. subtilis* МБ1 продукувала найбільшу кількість сидерофорів.

4. Найбільш інтенсивне накопичення біомаси спостерігалось в асоціаціях зі складом: *B. subtilis* МБ1 та *P. fluorescens* ATCC 13225, або *B. subtilis* МБ1 та *P. chlororaphis* ONU 301.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Леонов В. В. Микробные сидерофоры: строение, свойства и функции / В. В. Леонов, А. Ю. Миронов, И. В. Ананьина, Е. Е. Рубальская, Л. Г. Сентюрова // Медико-биологические науки. – 2016. – Т. 5, № 4. – С. 27–28.

2. Сандовал Т. А. Генетический контроль транспорта сидерофоров у цианобактерий *Synechocystis* sp. / Т. А. Сандовал. – Москва: Московский государственный униветрситет имени М. В. Ломоносова, 2019. – С. 116.

3. Ahmed E. Siderophores in environmental research: roles and applications / E. Ahmed, S. J. M. Holmström // Microbal Biotechnology. – 2014. – Vol. 7, № 3. – P. 196–208.

4. Arora K. N. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria / K. N. Arora, M. Verma // 3 Biotech. – 2017. – Vol. 7, № 381. – P. 1210–1227.

5. Braun V. Recent insights into iron import by bacteria / V. Braun, K. Hantke // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2015. – Vol. 15, № 2. – P. 328–334.

6. Cappuccino J. G. Microbiology: A Laboratory Manual / J. G. Cappuccino, N. Sherman. – USA: Madison W. I., 2012. – 8th ed. – Vol. 13. – P. 978.

7. Christie G. Bacillus spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn / G. Christie, P. Setlow // World J. of Microbiol. and Biotechn. –2020. – Vol. 37, № 8. – P. 1341–1356.

8. Cohen S. Mixed hydroxypyridinonate ligands as iron chelators / S. M. Cohen, B. O'Sullivan, K. N. Raymond // Inorg. Chem. – 2010. – Vol. 39, № 19. – P. 339–346.

9. Cornelis P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads / P. Cornelis // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 86, № 6. – P. 1637–1645.

10. Cooper G. M. The Cell: A Molecular Approach / G. M. Cooper. – Washington ASM Press.: DC, 2010. – P. 106.

11. Crosa J. H. Iron transport in bacteria / J. H. Crosa, A. R. Mey, S. M. Payne. – Washington: ASM Press, 2014. – 499p.

12. De la Rosa-Garcia S. C. Antimicrobial properties of moderately halotolerant bacteria from cenotes of the *Yucatan peninsula* / S. C. De la Rosa-Garcia, A. A. Munoz-Garcia, L. F. Barahona-Perez, M. M. Gamboa-Angulo // Lett. Appl. Microbiol. – 2017. – Vol. 45, № 3. – P. 289–294.

13. De Serrano O. L. Biotechnology of siderophores in high-impact scientific fields / O. L. De Serrano // BioMol. Concepts. – 2017. – Vol. 8, № 3. – P. 169–178.

14. Dimkpa C. O. Metalinduced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores / C. O. Dimkpa, D. Merten, A. Svatoš, G. Büchel, E. Kothe // Soil Biol. Biochem. – 2017. – Vol. 41. – P. 154–162.

15. Fukushima T. Grampositive siderophore shuttle with iron exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB / T. Fukushima, B. E. Allred, A. K. Sia, R. Nichiporuk, U. N. Andersen, K. N. Raymond // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 2013. – Vol. 110, № 34. – P. 821–826.

16. Flannery A. R. Pathways of iron acquisition and utilization in *Leishmania* / A. R. Flannery, R. L. Renberg, N. W. Andrews // Curr. Opin. Microbiol. – 2013. – Vol. 16, № 6. – P. 716–721.

17. Gamalero E. Mechanisms used by plant growth‑promoting bacteria. In Bacteria in Agrobiology: Plant Nutrient Management / E. Gamalero, B. R. Glick. – Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2018. – 746p.

18. Ghosh S. K. The qualitative and quantitative assay of siderophore production by some microorganisms and effect of different media on its production / S. K. Ghosh, S. Pal, N. Chakraborty // Int. J. Chem. Sci. – 2015. – Vol. 13, № 4. – P. 1621-1629

19. Haas H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage / H. Haas // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – Vol. 62, № 4. – P. 316–330.

20. Haselwandter K. Ferricrocinan, ectomycorrhizal siderophore of *Cenococcum geophilum* / K. Haselwandter, G. Winkelmann // BioMetals. – 2012. –

Vol. 15, № 1. – P. 73–77.

21. Hider R.C. Chemistry and biology of siderophores / R. C. Hider, X. Kong // Natural Product Reports. – 2016. – Vol. 17, № 10. – P. 27.

22. Kapali S. Isolation and characterization of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and their in vitro evaluation / S. Kapali, R. M. Gade, A.V. Shitole, S. Swathi // Adv. Life Sci. – 2016. – Vol. 5, № 16. – P. 5856–5859.

23. Kobayakawa F. Screening of streptomycetes for production of desferrioxamines / F. Kobayakawa, S. Kodani // J. Pure Appl. Microbiol. – 2015. – Vol. 66, № 4. – P. 1553–1558.

24. Krywulak K. D. Structural biology of bacterial iron uptake / K. D. Krewulak, H. J. Vogel // Biochim. Biophys. Acta. – 2018. – Vol. 1778, № 9. – P. 1781–1804.

25. Kurth C. Siderophores as molecular tools in medical and environmental applications / C. Kurth, H. Kage, M. Nett // Org. Biomol. Chem. – 2016. – Vol. 14, № 35. – P. 8212–8227.

26. Madigan M. Brock Biology of Microorganisms / M. Madigan, J. Martinko. – Prentice Hall, 2016. – 11th ed. – P. 345.

27. Masalha J. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower / J. Masalha, H. Kosegarten, Ö. Elmaci, K. Mengel // Biol. Fertil. Soils. – 2010. – Vol. 30, № 5. – P. 433–439.

28. Miethke M. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control / M. Miethke, M. A. Marahiel // Microbiol. Mol. Biol. Reviews. – 2015. – Vol. 71, № 3. – P. 413–451.

29. Minkwitz A. Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* / A. Minkwitz, G. Berg // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 39, № 1. – P. 139–145.

30. Ninfa A. J. Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology / A. J. Ninfa, D. P. Ballou, M. Benore. – Hoboken: Wiley & Sons,

2013. – 2th ed. – P. 253.

31. Noinaj N. TonB‑dependent transporters: regulation, structure and function / N. Noinaj, M. Guillier, T. J. Barnard, S. K. Buchanan // Annu Rev. Microbiol. – 2015. – Vol. 64. – P. 43–60.

32. Pal K. K. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina, Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria / K. K. Pal, K. V. Tilak, A. K. Saxena, R. Dey, C. S. Singh // Microbiol. Res. – 2012. – Vol. 156, № 3. – P. 209–223.

33. Payne S. M. Detection, isolation, and characterization of siderophore / S. M. Payne // Methods Enzymol. – 2005. – V. 235. – P. 329–344.

34. Rajkumar M. Potential of siderophore‑producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction / M. Rajkumar, N. Ae, M. N. V. Prasad, H. Freitas // Trends Biotechnol. – 2018. – Vol. 28, № 3. – P. 142–149.

35. Raymond K. N. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport / K. N. Raymond, E. A. Dertz, S. S. Kim // Proceed. NAS of USA. – 2013. – Vol. 100, № 7. –P. 3584–3588.

36. Rivault F. Synthesis of pyochelin-norfloxacin conjugates / F. Rivault, C. Liebert, A. Burger, F. Hoegy, M. A. Abdallah, I. J. Schalk, G. L. Mislin // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2017. – Vol. 17, № 3. – P. 640–644.

37. 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 // Curr. Med. Chem. – 2012. – Vol. 7, № 2. – P. 210.

38. Ryan K. J. Sherris Medical Microbiology / K. J. Ryan, C.G. Ray. – New York: McGraw Hill, 2015. – 4th ed. – P. 129.

39. Schalk I. J. Minireview new roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance / I. J. Schalk, , M. Hannauer, A. Braud // Env. Microbiol. – 2014. – Vol. 13, № 11. – P. 2844–2854.

40. Silva-Stenico M. E. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity / M. E. Silva-Stenico, C. S. Pamplona, A. S. Lorenzi, T. K. Shishido, A. Etchegaray, S. P. Lira, L. A. Moraes, M. F. Fiore // Microbiol. Res. – 2019. – Vol. 166, № 3. – P. 161–175.

41. Souto A. Synthesis and antibacterial activity of conjugates between

norfloxacin and analogues of the siderophore vanchrobactin / A. Souto, M. A. Montaos, M. Balado, C. R. Osorio, J. Rodriguez, M. L. Lemos, C. Jiménez // Bioorg. Med. Chem. – 2013. – Vol. 21, № 1. – P. 295–302.

42. Wang Q. Effect of applying an arsenic‐resistant and plant growth‐promoting rhizobacterium to enhance soil arsenic phytoremediation by *Populus deltoides* LH05–17 / Q. Wang, D. Xiong, P. Zhao, X. Yu, B. Tu , G. J. Wang Appl // Microbiol. – 2015. – Vol. 111, № 5. – P. 1065–1074.

43. Wencewicz T. A. Trihydroxamate siderophore-fluoroquinolone conjugates are selective sideromycin antibiotics that target *Staphylococcus aureus* / T. A. Wencewicz, T. E. Long, U. Mollmann, M. J. Miller // Bioconj. Chem. – 2013. – Vol. 24, № 3. – P. 473–486.

44. Winkelmann G. Ecology of siderophores with special reference to the fungi / G. Winkelmann // Biometals. – 2013. – Vol. 20, № 3. – P. 379–392.

45. Verma V. C. Biocontrol and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* / V. C. Verma, S. K. Singh, S. Prakash // J. Basic. Microbiol. – 2016. – Vol. 51, № 5. – P. 550–556.

46. Yadav S. Diversity and phylogeny of plant growth promoting bacilli from moderately acidic soil / S. Yadav, R. Kaushik, A. K. Saxena, D. K. Arora // J. Basic. Microbiol. – 2015. – Vol. 51, № 1. – P. 98–106.

47. Yu X. The siderophore producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper / X. Yu, C. Ai, L. Xin, G. Zhou // Eur. J. Soil. Biol. – 2016. – Vol. 47, № 2. – P. 138–145.

48. Zwietering M. H. Modeling of the Bacterial Growth Curve / M. H. Zwietering, I. Jongenburger, F. M. Rombouts, van 'T Riet K // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Vol. 56, № 6. – P. 1875–1881.

10.05.2022 Ольга ШВЕЦЬ

(підпис)