

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 «**Оптимізація синтезу вторинних метаболітів**

консорціумами морських бактерій»

«Optimization of the synthesis of secondary metabolites by consortia of marine bacteria»

Виконав: студент денної форми навчання
спеціальність

162 Біотехнології та біоінженерія

Рогалевський Микола Володимирович

Науковий керівник:

Доктор біологічних наук, професор
Філіпова Тетяна Олегівна

Рецензент:

кандидат біологічних наук, доцент
Білоконь Світлана Василівна

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)

Анотація

Експериментальна частина дипломної роботи була виконана у Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Побудовано технологічну схему виробництва вторинних метаболітів морськими бактеріями *Bacillus* та *Pseudomonas* та їх консорціумами. Одержано 42 зразки вторинних метаболітів досліджуваних морських бактерій. Встановлено, що найбільшу кількість цільових продуктів синтезують консорціуми *B. subtilis* МС3 з *P. aeruginosa* М1 та М4 за присутності у поживному середовищі морської води. Використання синтетичної морської води фактично не впливало на кількість вторинних метаболітів. Оцінка протипухлинної активності вторинних метаболітів монокультур *B. subtilis* МС3 з *P. aeruginosa* М1 та їх консорціуму (МС3+М1) довела, що продукти саме ко-культури володіють найвищою антипроліферативною дією.

Дипломну роботу викладено на 40 сторінках, вона містить 5 таблиць та 9 рисунків. Наведено посилання на 45 джерел літератури.

Ключові слова: вторинні метаболіти, морські бактерії, *Pseudomonas*, *Bacillus*, умови культивування

The experimental part of the diploma work was performed at the Biotechnological Scientific and Educational Center of Odesa National University named after I. I. Mechnikov.

A technological scheme for the production of secondary metabolites by marine bacteria *Bacillus* and *Pseudomonas* and their consortia was constructed. 42 samples of secondary metabolites of the studied marine bacteria were obtained. It was established that the largest number of target products are synthesized by consortia of *B. subtilis* MC3 with *P. aeruginosa* M1 and M4 in the presence of seawater nutrient medium. The use of synthetic seawater actually did not affect the amount of secondary metabolites. Evaluation of the antitumor activity of secondary metabolites of monocultures of *B. subtilis* MC3 with *P. aeruginosa* M1 and their consortium (MC3+M1) proved that the products of the co-culture have the highest antiproliferative effect. The thesis is presented on 46 pages, it contains 5 tables and 9 figures. References to 45 sources of literature are given.

Key words: secondary metabolites, marine bacteria, *Pseudomonas*, *Bacillus*, cultivation conditions

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	4
1.ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1.Класифікація вторинних метаболітів морських бактерій	7
1.2.Підходи до стимуляції синтезу вторинних метаболітів бактерій	9
1.2.1.Фізичні умови	10
1.2.2.Пошук ефективних еліситорів	11
1.2.3.Культивування на неоднорідних, складних поверхнях	14
1.2.4.Ко-культивування (метод консорціумів)	16
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	20
2.1. Штами бактерій та умови їх культивування	20
2.2. Методичні підходи до оптимізації синтезу вторинних метаболітів	20
2.3. Методи екстракції вторинних метаболітів та визначення їх маси	22
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	23
3.1. Технологічна схема одержання сидерофорів морських бактерій ...	23
3.2. Синтез сидерофорів у моно- та ко-культурах бактерій родів <i>Bacillus</i> та <i>Pseudomonas</i> , виділених з мідій Чорного моря	25
3.3. Визначення протипухлинної активності вторинних метаболітів ...	30
УЗАГАЛЬНЕННЯ	32
ВИСНОВКИ	34
СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	35

ВСТУП

Протягом усієї історії людство використовувало й добувало біоресурси Світового океану. Довгий час сферою найбільшого інтересу були промислові риби, молюски, водорості, морські ссавці тощо. Проте зараз все більшу й більшу увагу привертає мікробіологічне розмаїття Океану. Світовий океан представляє собою унікальну нішу для мікроорганізмів, оскільки це середовище характеризується нерегулярним постачанням поживних речовин, непостійною концентрацією кисню, градацією товщі води за освітленістю Сонцем, високим гідратним тиском, солоністю, що змінюється. Різноманіття морської мікробіоти разом з її можливістю синтезувати ще невивчені сполуки привертають увагу безлічі вчених з різних галузей [Галкін та інш., 2022].

Багато оглядів повідомляють про доведену біологічну активність вторинних метаболітів мікроорганізмів, які можуть бути використанні у фармакологічній галузі. Так, були виділені метаболіти з протираковою, антибіотичною, протигрибковою та антипаразитичною дією. Останні відомості відкривають перспективу для дослідження і відкриття взагалі нових класів антибіотичних препаратів [Andryukov et al., 2019; Jeewon et al., 2019; Кондрашевська та ін., 2018; Walsh et al., 2014].

Хоча метаболіти умовно вважають низькомолекулярними речовинами, сучасна наука ділить метаболіти мікроорганізмів на два типи: первинні та вторинні. Первинні метаболіти синтезуються клітинами мікроорганізмів задля забезпечення власного виживання: вони слугують основним джерелом енергії, кінцеві продукти беруть участь у синтезі макромолекул, можуть забезпечувати комунікаційну функцію однієї колонії клітин. Одним словом, ці метаболіти необхідні для підтримання життєдіяльності. Вторинні метаболіти не є життєво важливими сполуками мікроорганізмів, проте вони захищають клітини у несприятливий період, можуть мати антибіотичну дію,

що сприяє покращенню конкурентоспроможності. Але антибіотичною дією їх біологічні властивості не вичерпуються. Вторинні метаболіти також мають такі функції: захист від суворих дій навколишнього середовища; один з факторів QS у біоплівках і т.д. Загалом, вони сприяють покращенню конкурентоспроможності певної колонії проти інших мікроорганізмів.

Ще одна важлива різниця між первинними та вторинними метаболітами – це різний період активного синтезу відповідних метаболітів. Так, первинні метаболіти синтезуються найінтенсивніше з початку фази експоненціального росту бактерій (лаг-фази), а вторинні – зі стаціонарної фази (рис. 1) [Andryukov et al., 2019; Кондрашевська та ін., 2018].

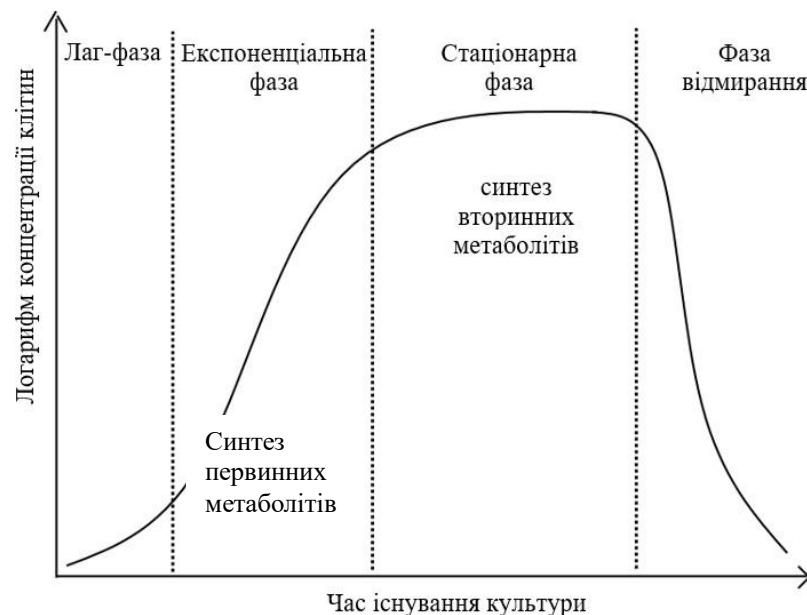


Рис. 1. Графік росту бактеріальної культури, графік поділений на відповідні фази [Andryukov et al., 2019; Кондрашевська та ін., 2018].

Основною проблемою промислового добування корисних вторинних метаболітів з мікроорганізмів є «мовчання» при звичайних лабораторних умовах генних кластерів, що кодують ферменти, відповідальні за їх синтез. Тому основною задачею стимулювання виробництва ВМ, а також пошуку нових метаболітів, стає «пробудження» таких генів. Так, виділяють такі підходи стимуляції біосинтезу: додавання до субстрату малої кількості

еліситорів, інкубування культури на неоднорідному (пористому або шорсткому) субстраті (scaffold-культивування), ко-культивування (створення консорціумів) та створення стресу через фізичні чинники [Hailey et al., 2019].

Мета роботи – охарактеризувати способи стимуляції біосинтезу вторинних метаболітів морських бактерій, зокрема метод створення консорціумів, проаналізувати сучасні перспективи використання та дослідження вторинних метаболітів морських бактерій.

Для досягнення вказаної мети вирішували такі **завдання**:

1. Розробити технологічну схему виробництва вторинних метаболітів морськими бактеріями *Bacillus* та *Pseudomonas* та їх консорціумами.
2. Порівняти вихід цільових продуктів за різних умов культивування досліджуваних бактерій: моно- та ко-культивування, використання синтетичної та природної морської води.
3. Оцінити внесок кожного зі змінних факторів в ефективність синтезу вторинних метаболітів морськими бактеріями.
4. Порівняти біологічну активність вторинних метаболітів монокультур *B. subtilis* МС3, *P. aeruginosa* М1 та їх консорціуму (МС3+М1).

Об'єкт дослідження – синтез вторинних метаболітів морськими бактеріями

Предмет дослідження – ефективність синтезу вторинних метаболітів представниками *Bacillus* та *Pseudomonas*, виділених з мідій Чорного моря, у різних умовах їх культивування.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Класифікація вторинних метаболітів морських бактерій

Багато нині відомих вторинних метаболітів (ВМ) були виділені бактеріями класу *Actinobacteria*, найбільш потужного роду *Streptomyces*, оскільки саме з актиноміцетів було синтезовано найбільшу кількість антибіотиків та полікетидів. Разом з тим, різні штами бактерії *Bacillus subtilis* – також чудові продуценти різних корисних речовин, таких як бактеріоцид ентиомін і антифунгальний білок E2. Слід відмітити також бактерії роду *Pseudoalteromonas*, для якого характерний синтез віалоцеїну, цінного антибіотику та пігменту [Jeewon et al., 2019; Andryukov et al., 2019; Кондрашевська та ін., 2018; Palazzotto et al., 2018].

Цікаво те, що механізми синтезу ВМ дуже різноманітні, позаяк часто ВМ є нерибосомального походження, хоча є також рибосомально-полікетидні метаболіти. Серед різноманітних нерибосомальних механізмів можна виділити полікетидний тип синтезу, синтез з використанням β -лактамів, шикинової кислоти, олігосахаридів [Zhang et al., 2020; Andryukov et al., 2019]. Багато ВМ, що мають антибактеріальну активність, синтезуються не рибосомально, а специфічним класом ферментів, так званими, пептид-синтетазами. Нерибосомальні пептидні метаболіти малі, порівняно з білками, що синтезуються рибосомальним шляхом.

Якщо рибосомальні білки складаються з послідовностей 20 природних амінокислот, що кодуються на мРНК перед власне синтезом (трансляцією) поліпептида, то нерибосомальні пептиди можуть складатися з модифікованих або непротеїногенних амінокислот, а їх послідовність буде чітко детермінованою активністю та структурою пептид-синтетази. Можна навести такі класи нерибосомальних антибактеріальних ВМ: полікетиди, циклічні ліпопептиди, лактини, поліпептиди (циклічні депсипептиди, циклічні

декапептиди) [Zhang et al., 2020; Andryukov et al., 2019].

До того ж, неодноразово з'являються відомості про синтез біологічних ПАР (біоПАР), які можуть бути використані задля очищення стічних вод від важких елементів, поліароматичних речовин, продуктів нафтової промисловості, пестицидів й інших поллютантів. Основною ознакою сурфактантів є гідрофільно-ліпофільна рівновага, яка надає цим сполукам як гідрофільну, так і гідрофобну природу. Завдяки амфіфільній природі біоПАР здатні зменшувати поверхневий натяг води, а також змінювати властивості поверхні клітин мікроорганізмів. Так, гідрофільна частина може складатися з оліго-, полі- або моносахаридів, білків або пептидів, а гідрофобна – з насичених або ненасичених жирнокислотних залишків.

Досліджування біосурфактантів, а особливо проектування та вдосконалення методів промислового отримання біосурфактантів є перспективним, оскільки синтетичні поверхнево-активні речовини (ПАР) досить сильно впливають на природу у цілому: багато синтетичних ПАР токсичні, пригнічують ріст мікроорганізмів; ПАР можуть утворювати плівку на поверхні води і, таким чином, перешкоджати доступу кисню до води; вказано, що вони пригнічують розвиток молюсків та водоростей. До того ж, синтетичні поверхнево-активні речовини можуть бути ще й гіпералергенними для людини [Deerika et al., 2021].

Синтетичні сурфактанти довго або зовсім не розкладаються у природному середовищі, що призводить до вторинного ефекту, накопичення їх у біоценозі. Серйозні загрози можуть з'являтися від відносно нетоксичних ПАР, продукти розпаду яких набагато токсичні [Johnson et al., 2021]. У природі біологічні ПАР беруть участь у процесах розкладання та дезактивації нафтових продуктів, промислової поліароматики, важких металів, пестицидів. Це відбувається завдяки емульсіфікації розчину вода-поллютант, що підвищує доступність забруднювача до подальшого природного утилізування [Deerika et al., 2021].

Також перспективним для вивчення й пошуку ефективного синтезу є

ВМ біохімічного класу меротерпеноїдів, які синтезують деякі морські гриби та бактерії класу *Actinobacteria*. Меротерпеноїди – це клас сполук, в яких терпеноїдні залишки пов'язані з різними молекулами різноманітної біохімічної природи. Таким чином, меротерпеноїди – це багатий біохімічний клас речовин, до якого відносять чисельні групи біоактивних речовин. Серед меротерпеноїдів є також протиракові сполуки, властивості яких вивчаються зараз найінтенсивніше. Основні підкласи меротерпеноїдів, що найчастіше виділяють з морської мікробіоти такі: терпенил-полікетиди, терпенил-алкалоїди, терпенил-глікозиди [Nelson et al., 2014].

1.2. Підходи до стимуляції синтезу вторинних метаболітів бактерій

ВМ не є необхідними для підтримання життєдіяльності, тому ВМ синтезуються, коли клітина має стимул до активації додаткового механізму виживання. А тому синтез ВМ буде низьким, або може бути зовсім відсутнім при оптимальних лабораторних умовах. Таким чином, основні методи стимуляції ВМ полягають у тому, щоб наблизити умови культивування бактеріологічної культури до природних, або підтримувати для культури стресові умови. Можна відмітити такі підходи до стимуляції синтезу вторинних метаболітів: пошук ефективних еліситорів; культивування на поверхнях, що подібні до природних рельєфів, з яких були ці культури ізольовані; ко-культивування; стрес від змін фізичних умов (температури, рН-шок, тиск) (рис. 2).

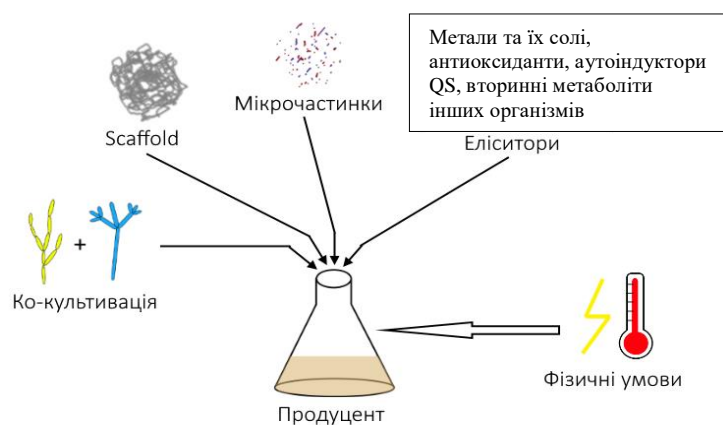


Рис. 2. Схематичне узагальнення підходів до стимуляції синтезу

вторинних метаболітів морськими бактеріями (власна схема)

1.2.1. Фізичні умови

Існують фізичні фактори, які можуть впливати на синтез певних вторинних метаболітів. Оптимальний підбір та контроль фізичних умов у сталому режимі дозволить стимулювати біосинтез ВМ. Контроль фізичних умов у мікробіологічному виробництві – це найпростіша стратегія оптимізації виробництва, а тому її завжди беруть до уваги і шукають або емпіричним методом встановлюють оптимальні режими культивування для певного метаболіту. Слід зазначити, що не завжди стаціонарні фізичні умови є оптимальними, позаяк іноді необхідно піддати культуру фізичному стресу, аби певні ВМ краще синтезувалися або синтезувалися нові ВМ, які за благо сприятливих умов не синтезуються взагалі. Фізичні характеристики, які розглянуті у цьому розділі такі: температура, світлове опромінення.

Те, що температурний стрес можна використовувати як інструмент для отримання нових метаболітів показали Zeng et al. (2017), коли вони отримали новий меланіновий пігмент піомеланін. Вони піддали культуру *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 температурному шоку у 37 °С, коли культура тільки починала формувати біоплівки. Був знайдений ген *melA*, який кодує фермент гідроксифенилпіруват діоксигеназу. Цей фермент каталізує перетворення 4-гідроксифенилпіруват у гомогентизінову кислоту, яка потім автоокиснюється і полімеризується у піомеланін. Була перевірена теплозахисна властивість піомеланіну для клітин бактерій: мутанти з інгібованим геном *melA* не витримували високої для них температури.

Іноді буває так, що культура росте оптимально при одній температурі, а при іншій – оптимально продукується якийсь ВМ. Це показали вчені Alonso et al. (2017), які встановили, що *Pseudomonas taetrolens* краще росте при 28 °С, а синтез лактобіонічної кислоти, – яку можна використовувати як біосурфактант, хелатор металів, розчинник антибіотиків [Hailey et al., 2019], – при температурі 30 °С. Це означає, що для оптимального біосинтезу

лактобійонічної кислоти необхідно спочатку вирощувати *P. taetrolens* до стаціонарної фази при 28 °С, а потім підняти температуру до 30 °С, щоб отримувати більше цієї кислоти.

Ще один параметр фізичних умов, який можна використовувати для оптимізації виробництва лактобійонічної кислоти, є світлове опромінювання культури. Shu et al. (2018) довели, що опромінювання *P. taetrolens* світлом з LED-ламп. Відомо, що *P. taetrolens* мають два типи фоторецепторів: спеціалізовані на довжину хвилі червоного і синього спектру відповідно. Тому цікаво зазначити, що сині фоторецептори підвищували швидкість росту, а червоні – активізували синтез лактобійонічної кислоти.

1.2.2. Пошук ефективних еліситорів

Основний принцип дії – індукування експресії біосинтетичних генних кластерів, і саме елісители можуть спонукати до цього. Елісители – це молекули, що взаємодіють з білками-рецепторами клітини, активуючі певні генні кластери, які експресуються або на дуже слабо рівні, або експресія за звичайних умов взагалі відсутня. Від інших сигнальних молекул (гормонів, сигнальних ВМ, клітинних месенджерів) елісители відрізняються тим, що вони не властиві організму за звичайних умов і є фактором посилення клітинних захисних механізмів від зовнішнього середовища.

Пошук потрібного елісителя для необхідного метаболіта потребує багато спроб-помилки, проте була сформована методика для знаходження та ідентифікування еліситорів – ВПСЕ. Під час цього методу культури проходять скринінг проти бібліотеки еліситорів, які включають антибіотики, метали, сполуки лантану тощо. Після культивування досліджують фенотипові прояви окремих культур та співвідносять діючі елісители [Zhang et al., 2020; Hailey et al., 2019; Seyedsayamdost, 2014].

На сьогодні показано, що додавання ефективних еліситорів є одним з найдієвіших дієвим методом стимуляції неактивних генних кластерів. За такою стратегією варто враховувати який метал вибрати в якості елісителя та

в якій концентрації. У сучасній біотехнології як елісатори також використовуються такі сполуки іони металів: кобальт, марганець, хром, нікель, цинк і кадмій [Hailey et al., 2019].

Класичним прикладом дуже ефективного використання елісаторів є досліді Pospisil and Sedmera (1998), які встановили, що біосинтез антибіотика монензину від *Streptomyces cinnamonensis* підвищується у 3,5 рази, якщо додавати у культуру малу кількість антиоксидантів бутилованого гідроксианізола та бутилованого гідрокситолуена.

Слід ще вказати, що ВПСЕ може використовуватися не лише для пошуку елісаторів як стимуляторів для біосинтезу вже відомих вторинних метаболітів певного штаму. Позаяк деякі метаболіти продукуються лише через елісаторні фактори, можна отримувати нові ВМ, які за звичайних лабораторних умов не отримали б. ВМ, які потребують елісаторів для активації синтезу, називають тихими або латентними (в оригіналі «silent» або «cryptic») [de Felicio et al., 2021; Zhang et al., 2020].

Використовуючи модифікований метод ВПСЕ був виявлений новий метаболіт депсипептид цинапептин з *Streptomyces ghanaensis*, за результатами статті Zhang et al. [2020]. Вважається, що цинапептин може проявляти антимікробіальну активність. Дослідження цікаве тим, що в ньому використовувався метод пошуку елісаторів (ВПСЕ) для знаходження латентного метаболіту, який не продукувався при нормальних лабораторних умов. Виявилось, що найбільш ефективними елісаторами для синтезу цинапептина з *S. ghanaensis* є пікеатаннол, амигдалин, гомобутеїн, сарсапогенін – це все рослинні метаболіти, які грають важливу роль для розвитку симбіозу рослини з *S. ghanaensis*. Сам метод ВПСЕ був використаний у тандемі з МАЛД/І МС: цей метод аналізу дозволяє швидко і якісно виявити пептиди та інші високомолекулярні речовини [Zhang et al., 2020].

Сама схема дослідження елісаторів виглядає наступним чином: виділяється культура бактерій, яка потім переноситься у кожну лунку

культурального планшету з тією умовою, щоб утворилася біоплівка. Вносять у кожен лунку окремий потенційний еліситор з уже підготовленої бібліотеки еліситорів і культивують; потім культуральну речовину з кожної лунки аналізують певним чином, -- у випадку дослідження Zhang et al. [2020] це МАЛД/І МС з режимом позитивного іонного визначення (рис. 3).

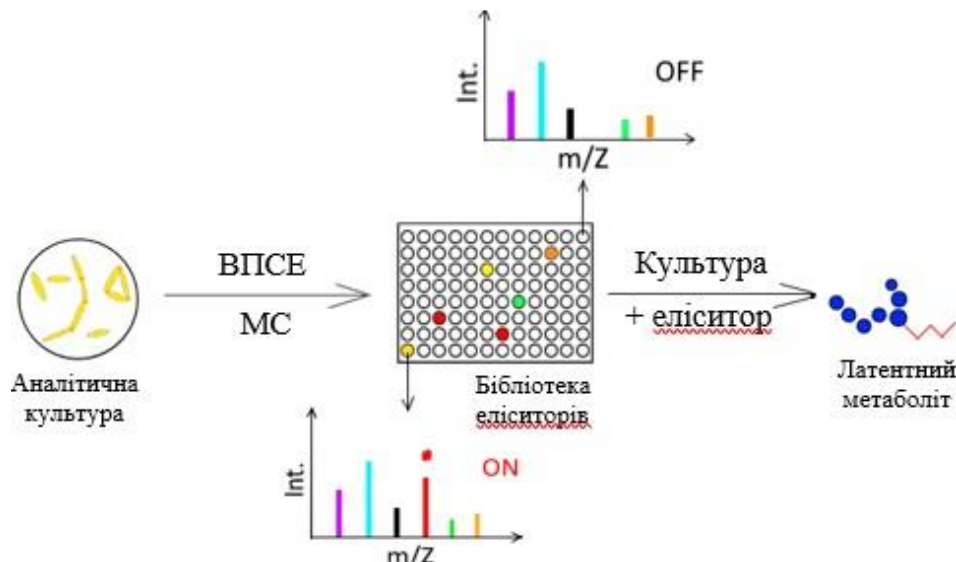


Рис. 3. Схема дослідження невідомого латентного метаболіту за допомогою методу ВПСЕ у тандемі з МАЛД/І МС (за Zhang et al., 2020).

Є результати, що говорять про сильну стимуляцію метаболізму у *Vibrio parahaemolyticus* іонами Fe^{3+} . Цікаво, що стимулюється синтез як вторинних, так і первинних метаболітів [Zhou et al., 2017]. Таке явище пов'язують з тим, що *V. parahaemolyticus* є патогеном у кров'яному середовищі.

Елісителями можуть бути похідні глюкози, такі N-ацетилглюкозамін. У роботі Dashti [2017] описано, як було досліджено вплив цієї сполуки на дев'ятьох представників морських актиноміцетів, серед яких три види змінили синтез метаболітів. Ці представники - *Micromonospora* sp. RV43, *Rhodococcus* sp. RV157, *Actinokineospora* sp. EG49.

Велику увагу приділяють вивченню інгібіторів гістонодеацетилаз, ферментів, що видаляють ацетильні групи з N-хвостів гістонів, використовуючи в якості модельних організмів актиноміцети. Гістонові хвости, у свою чергу, часто модифікуються метильними, ацетильними

групами, що звичайно впливають на процес транскрипції. Хоча механізм дії такого явище ще досі не з'ясований і потребує подальшого вивчення, зрозуміло, що гістонодеацетилази активують латентні генні кластери. До інгібіторів гістонодеацетилаз входять такі класи сполук як бензаміди, лінійні полікетиди, флавоноїди, філоалексини, депсипептиди, короткі жирні кислоти [Moore et al., 2012; Hailey et al., 2019].

1.2.3. Культивування на неоднорідних, складних поверхнях

Часто морська мікробіота формує тісні взаємини з іншими морськими організмами. Наприклад, бактерії роду *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Flavobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria* живуть на поверхні морських губок і продукують біологічно активні речовини [Brinkman et al., 2017]. Для того, щоб імітувати поверхню губки або коралів, використовують якийсь пористий нитковий матеріал, – наприклад, бавовняні кульки (рис. 4). Відомо, що така складна матрична структура допомагає утворенню біоплівкових форм існування бактерій, що посилює синтез метаболітів [Timmermans et al., 2019; Hailey et al., 2019]. Проте такий підхід може виявитися марним, якщо бактерія не утворює біоплівкові форми.

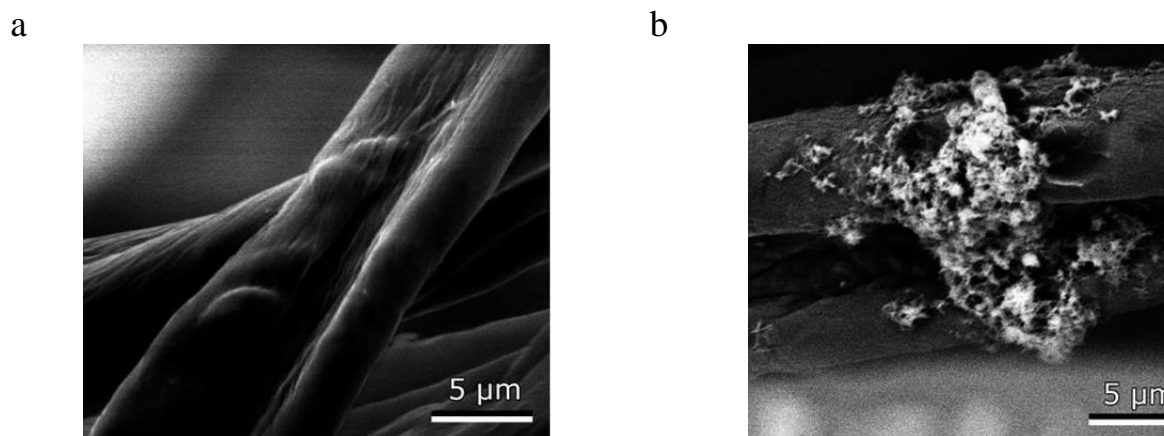


Рис. 4. Електронномікроскопічне зображення: (а) бавовняних волокон без біоплівки; (б) бавовняних волокон з біоплівкою *P. luteoviolacea* (за Timmermans et al., 2019).

Мікрочастинки – також добрий спосіб отримання біоплівкових форм бактерій. Зазвичай як мікрочастинки використовуються силікати або мікропластик.

Scaffold-культивування. Біоплівки утворюються з більшим шансом на складних, нерівних та шорохуватих поверхнях. Такі матеріали як бавовна утворюють ніби каркас, до якого легко адгезуються клітини, а потім утворюють біоплівку. Такий спосіб називається scaffold-культивуванням (культивуванням «на каркасі»).

Група дослідників [Timmermans et al., 2019] проводили культивування трьох видів з роду *Pseudoalteromona* (*P. luteoviolacea*, *P. piscicida* та *P. rubra*) з бавовняними кульками та без бавовняних кульок, аби перевірити різницю у метаболізмі бактерій. Відомо, що бактерії роду *Pseudoalteromona* синтезують такі відомі сполуки як віолацеїн, тіомаринол А, а також сполуки з хімічних класів продигинінів та альтерохромідів. Виявилось, що культура *P. rubra* не синтезувала нові сполуки на кульках, проте інтенсивність біосинтезу продигіозину підвищилась. Культура *P. luteoviolacea* у присутності бавовни продукувала рожевий барвник та антибіотик віолацеїн, антибіотик тіомаринол-А. Культура *P. piscicida* виробляла більше бромальтерохромідних метаболітів серед усіх альтерохромідів в асоціації з бавовною, а небромідних альтерохромідних, відповідно, було більше без бавовни. Узагалом, біосинтез метаболітів йшов інтенсивніше на бавовняній матриці, що можна було помітити візуально за більш інтенсивною окраскою середовища з бавовною у порівнянні з середовищем без бавовни. Цікаво те, що всі види утворювали біоплівку на субстраті з бавовняного матеріалу, хоча *P. piscicida* та *P. rubra* ізольовані просто з морської води на відміну від *P. luteoviolacea*, яка ізольована з морських губок та коралів.

Таким чином, зрозуміло, що структура бавовняної кульки стимулює утворення біоплівки, а тому збільшується синтез вторинних метаболітів.

Мікрочастинки. У суспензійних розчинах, де тверда фаза представлена пористими або негладкими мікрочастинками, бактерії також можуть утворювати біоплівки. Типи мікрочастинок, які можуть використовуватися для промислових або лабораторних цілей, такі: силікати (найчастіше використовують перемелений природний тальк) [Goswami et al., 2013], мікропластик (полістерин) [Foulon et al., 2016].

Учені з Індії, Goswami et al. [2013], досліджували оливкові штами *Pseudomonas*, ізольовані з морської води, і виявили, що вони підсилюють ріст рослин, а тому у перспективі їх можна використовувати як біодобриво. Для приготування біопрепарату використовували тальк.

Інша група дослідників з Франції, Foulon et al. [2016], повідомила, що на частинках мікропластику, що забруднює Світовий Океан, активно утворюються стійкі полівидові біоплівки, що потенційно, можуть бути патогенними. Було доведено, що морські бактерії-зообіонти можуть колонізувати мікропластик шорохуватий і згодом утворювати біоплівки. Це було показано на прикладі *Vibrio crassostreae*, що входить до нормальної мікробіоти морської устриці. Потенційно таку властивість можна використовувати цілеспрямовано, але для використання мікропластика як стимулятора біосинтеза ВМ необхідні подальші дослідження та експерименти.

1.2.4. Ко-культивування (метод консорціумів)

Ко-культивування – це тип створення культури в лабораторних умовах з використанням декількох видів організмів. До того ж організми можуть належати до різних таксонів, – родів, або навіть царств. Між клітинами різних видів виникають міжклітинні контакти, які призводять до синтезу метаболітів, що мають на меті біохімічне інформування між клітинами, виконання мутуалістичних відносин або підтримання конкурентноспроможності [Hailey et al., 2019; Marmann et al., 2014].

Дослідники намагаються зробити середовище культивування подібним

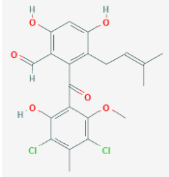
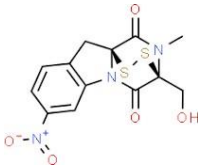
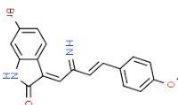
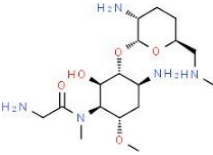
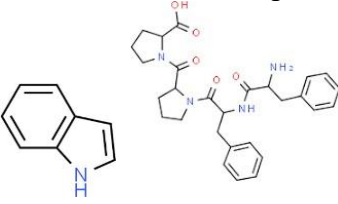
до природних, а тому культивують одну бактерію разом з бактерією з того самого середовища. Так, група дослідників [Seham El-Hawary et al., 2018] ко-культивувала *Saccharomonospora* sp. UR22 з *Dietzia* sp. UR66, що були ізольовані з губки *Callyspongia siphonella* (Червоне море). У результаті така культура просинтезувала нову речовину, -- новий інгібітор кінази Pim-1, пухлинного білка, який утворюється в значних кількостях при мієлоїдній лейкемії, раку передміхурової залози, колоректального раку або раку підшлункової залози.

Слід зазначити, що інколи використовують ко-культивування з організмами з різних царств, наприклад, мікроскопічних грибів із прокаріотами. Таке поєднання організмів дає широкий простір для проектування синтезу найрізноманітніших біологічно активних метаболітів. Найчастіше використовують пліснявий гриб *Aspergillus fumigatus* разом з бактеріями роду *Streptomyces*. Можна навести такий приклад ко-культивування представників різних царств (interkingdom co-cultures): ко-культивування *Aspergillus fumigatus* разом з *S. peucetius*. Така ко-культура синтезує форміл ксантоцилін, аналог фуміформаміду. Слід відмитити, що поодиноці ці організми не продукують цю речовину. Ще можна навести приклади ко-культури *Emericella* sp. разом з актиноміцетом *Salinispora arenicola*, що продукують разом два класа антимікробних кільцевих депсипептидів і емеріцеламіди A-D; морські мікроскопічні гриби *Pestalotia* sp. разом з морськими α -протеобактеріями (CNJ-32) синтезують антибіотик песталон; культивування разом тієї ж бактерії відповідно з морським грибом *Libertella* sp. дає чотири потужні цитотоксичні пімаранові дитерпеноїди та лібертелленони A–D [Hailey et al., 2019].

Деякі сучасні відомості про полікультури і вторинні метаболіти, які завдяки такому культивуванню продукуються, наведені у табл. 1.

Таблиця 1

Список полікультур з використанням морських бактерій та деякі їх продукти метаболізму [<http://www.chemspider.com>]

Види (морські бактерії та гриби)	Продукти метаболізму*	Біологічна активність	Джерело
<i>Pestalotia</i> sp. Невідома бактерія	Песталон 	?	[Zhu et al., 2011]
<i>Emericella</i> sp. <i>Salinospora arenicola</i>	Емірацеламід А, В	Антибіотик Цитотоксин	[Oh et al., 2007]
<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Sphingomonas</i> sp.	Гліонітрин А 	Антибіотик Цитотоксин	[Park et al., 2009]
<i>Saccharomonospora</i> UR22 <i>Dietzia</i> sp. UR66	Сахароміноспорин А  Конволютамідин F	Антибіотик Цитотоксин	[El-Hawary et al., 2019]
<i>Streptomyces tenjimariensis</i> 12 невідомих бактерій	Істаміцин 	Антибіотик	[Slatter et al., 2001]
<i>B. thuringensis</i> <i>B. Megaterium</i> <i>Staphylococcus sciuri</i>	Індол Phe-Pro дикетопіперазин 	Антибіотик	[Trishman et al., 2004]

Взагалі, можна підбити підсумки, що ко-культивування являє собою потужний інструмент пошуку нових вторинних метаболітів з різними біологічними властивостями, а також для отримання відомих сполук у більшій кількості. Проте використовувати та вивчати полікультури важче, аніж монокультури, що є недоліком цієї стратегії стимуляції біосинтезу вторинних метаболітів.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальна частина роботи була виконана у Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

2.1. Штами бактерій та умови їх культивування

У дослідженні були використані штами грам-негативних та грам-позитивних бактерій, які були виділені з мідій Одеської затоки Чорного моря. Грам-негативні бактерії були представлені трьома штамами *Pseudomonas aeruginosa* (M1, M3, M4) та 1 штамом *Alcaligenes faecalis*. Грам-позитивні бактерії – двома штамами бацил (*Bacillus subtilis* MC3 та *Bacillus atrophoeus* MN4).

Культивування проводили у скляних колбах об'ємом 300 мл, що містили по 120 мл поживного середовища. Посівна доза бактерій становила 6 мл добової культури з оптичною густиною 0,2 при 540 нм. Культивування проводили при 30 °C протягом 5 діб в умовах перемішування при 150 об/хв. Через 5 діб спектрофотометрично визначали кількість клітин у кожному варіанті і центрифугували культури 20 хв при 12000 об/хв для одержання безклітинних супернатантів.

Як базове застосовували середовище LB наступного складу, г/л: пептон – 15; дріжджовий екстракт – 10; NaCl – 5; дистильована вода – 1 л.

2.2. Методичні підходи до оптимізації синтезу вторинних метаболітів

У роботі було апробовано два підходи для підвищення синтезу вторинних метаболітів: модифікація складу поживного середовища та

культивування грам-позитивних та грам-негативних морських бактерій у складі подвійних консорціумів.

Модифікації складу поживного середовища здійснювали шляхом заміни дистильованої води на морську (модифіковане середовище 1) або додаванням до базового середовища додаткових солей, г/л: $MgCl_2 \times 6H_2O$ – 11; Na_2SO_4 – 4; $CaCl_2 \times 6H_2O$ – 2; KCl – 2; KBr – 0,7; H_3BO_3 – 0,1; NaF – 0,03 мг/л; NH_4NO_3 – 3 мг/л; $Fe(III)PO_4 \times 4H_2O$ – 1 мг/л (модифіковане середовище 2). Модифіковане середовище 2 ще має назву синтетичного морського середовища [<https://bacmedia.dsmz.de/medium/123>].

Другий підхід до підвищення синтезу вторинних метаболітів передбачував ко-культивування різних видів бактерій один з одним. У табл. 2 наведений склад досліджених подвійних культур.

Таблиця 2

Склад подвійних консорціумів морських бактерій

Варіант	Скорочені позначення	Варіант	Скорочені позначення
<i>B. subtilis</i> MC3 + <i>A. faecalis</i>	MC3+A.f	<i>B. atrophoeus</i> MH4 + <i>A. faecalis</i>	MH4+A.f
<i>B. subtilis</i> MC3 + <i>P. aeruginosa</i> M1	MC3+M1	<i>B. atrophoeus</i> MH4 + <i>P. aeruginosa</i> M1	MH4+M1
<i>B. subtilis</i> MC3 + <i>P. aeruginosa</i> M3	MC3+M3	<i>B. atrophoeus</i> MH4 + <i>P. aeruginosa</i> M3	MH4+M3
<i>B. subtilis</i> MC3 + <i>P. aeruginosa</i> M4	MC3+M4	<i>B. atrophoeus</i> MH4 + <i>P. aeruginosa</i> M4	MH4+M4

За умов культивування у складі консорціумів у колби вносили половинну кількість посівної дози кожного з мікроорганізмів, щоб стартова концентрація клітин була ідентична монокультурам.

По закінченні культивування визначали вміст клітин (спектрофотометрично при 540 нм) і потім враховували його при

розрахунках кількості вторинних метаболітів – приводили цей показник на 1,0 оптичної густини клітин.

2.3. Методи екстракції вторинних метаболітів та визначення їх маси

Екстракцію вторинних метаболітів здійснювали етилацетатом з без клітинних супернатантів культур.

Безклітинні супернатанти одержували центрифугуванням культур впродовж 20 хв при 12000 об/хв.

З без клітинних екстрактів відбирали по 100 мл супернатантів та додавали до них по 100 мл етилацетату та інтенсивно струшували. Після розшарування водного та етилацетатного шарів органічну фазу відбирали у чисті колби. Водний шар екстрагували ще двічі тим самим об'ємом етилацетату. Усі порції розчинника з одного зразка об'єднували та випарювали етилацетат при 40 °С до об'єму 2 мл, який переносили у попередньо зважені на аналітичних вагах поліетиленові пробірки епендорф з пробками. Далі випарювання залишків етилацетату, пробірки знов зважували та по різниці маси чистих пробірок та пробірок з вторинними метаболітами визначали масу останніх. Після цього пробірки щільно закривали пробками та зберігали у холодильнику при -20 °С

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Технологічна схема одержання вторинних метаболітів морських бактерій

Технологічна схема отримання вторинних метаболітів морських бактерій складається з таких етапів (рис. 5).

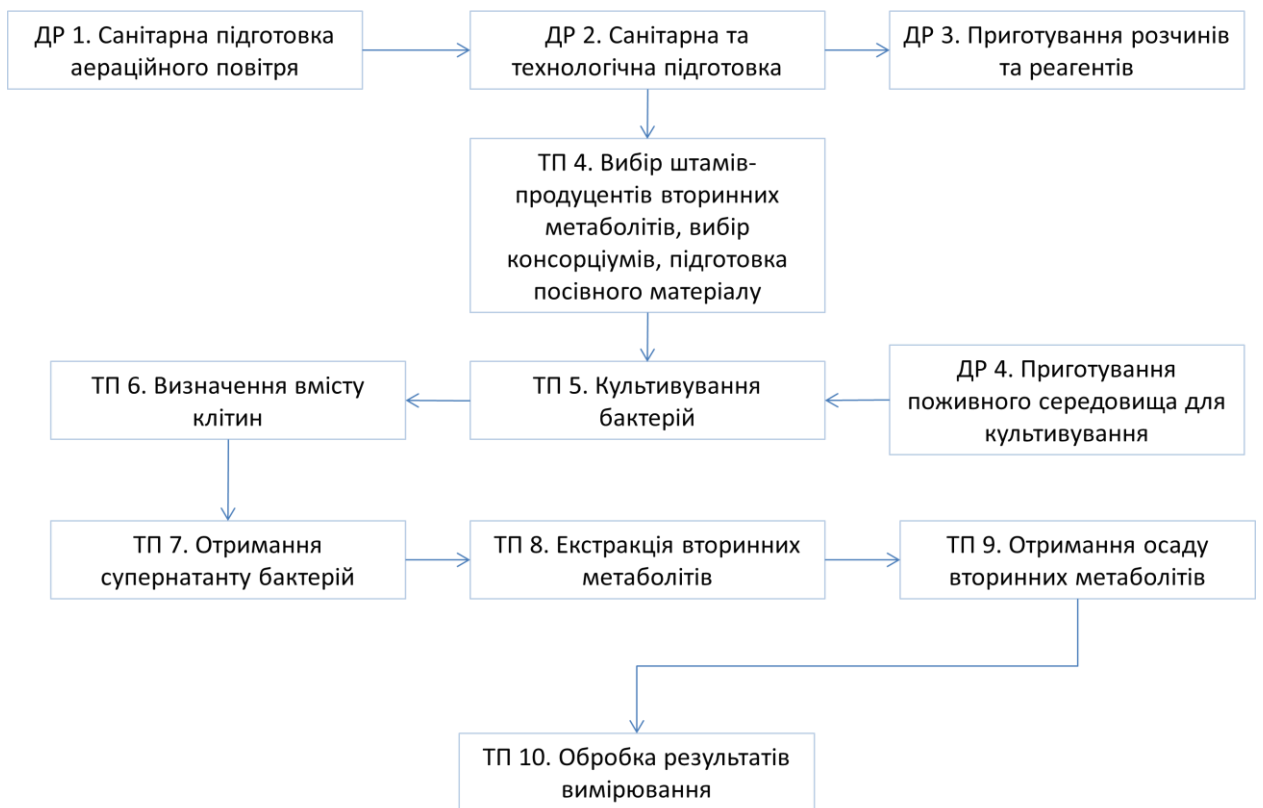


Рис. 5. Технологічна схема отримання вторинних метаболітів з морських бактерій

Стадії основного технологічного процесу (ТП) складаються з:

ТП 4. Вибір штамів-продуцентів вторинних метаболітів, вибір подвійних консорціумів. Для роботи обираються штами бактерій виділені з мідій Чорного моря. Підбирають подвійні консорціуми з грам-негативних та грам-позитивних бактерій.

ТП 5. Культивування бактерій, процес накопичення біомаси бактерій на приготованому середовищі. Культивування проводили при 30 °С протягом 5 діб в умовах перемішування при 150 об/хв.

ТП 6. Визначення кількості клітин у культурі консорціумів спектрометричним методом (540 нм).

ТП 7. Отримання супернатанту бактерій. Отримання надосадової рідини за допомогою методів центрифугування. Безклітинні супернатанти одержували центрифугуванням культур впродовж 20 хв при 12000 об/хв.

ТП 8. Екстракція вторинних метаболітів. З отриманого супернатанту виділяються сидерофори за допомогою методів з використанням розчинника етилацетата.

ТП 9. Отримання осаду вторинних метаболітів. Випаровування залишків етилацетату, зберігання осаду вторинних метаболітів у пробірці.

ТП 10. Обробка результатів вимірювання. Виконується фіксування та аналіз отриманих результатів. Зокрема, проводиться вимір ваги синтезованих вторинних метаболітів. Створюються відповідні характеристики штамів та консорціумів.

До стадій допоміжних робіт відносяться:

ДР 1. Санітарна підготовка аераційного повітря. Проводиться очистка повітря в лабораторних приміщеннях. Здійснюється контроль його чистоти.

ДР 2. Санітарна та технологічна підготовка роботи. Проводиться підготовка лабораторного обладнання, стерилізація посуду, прибирання приміщень. Виконується перевірка чистоти.

ДР 3. Приготування розчинів реагентів. Відбувається підготовка хімічних реагентів. Готуються їх розчини необхідні для подальших стадій роботи.

ДР 4. Приготування поживного середовища для культивування. Готується середовище LB необхідне для культивування обраних бактерій продуцентів (пептон – 15 г/л; дріжджовий екстракт – 10 г/л; NaCl – 5 г/л; дистильована вода – 1 л).

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

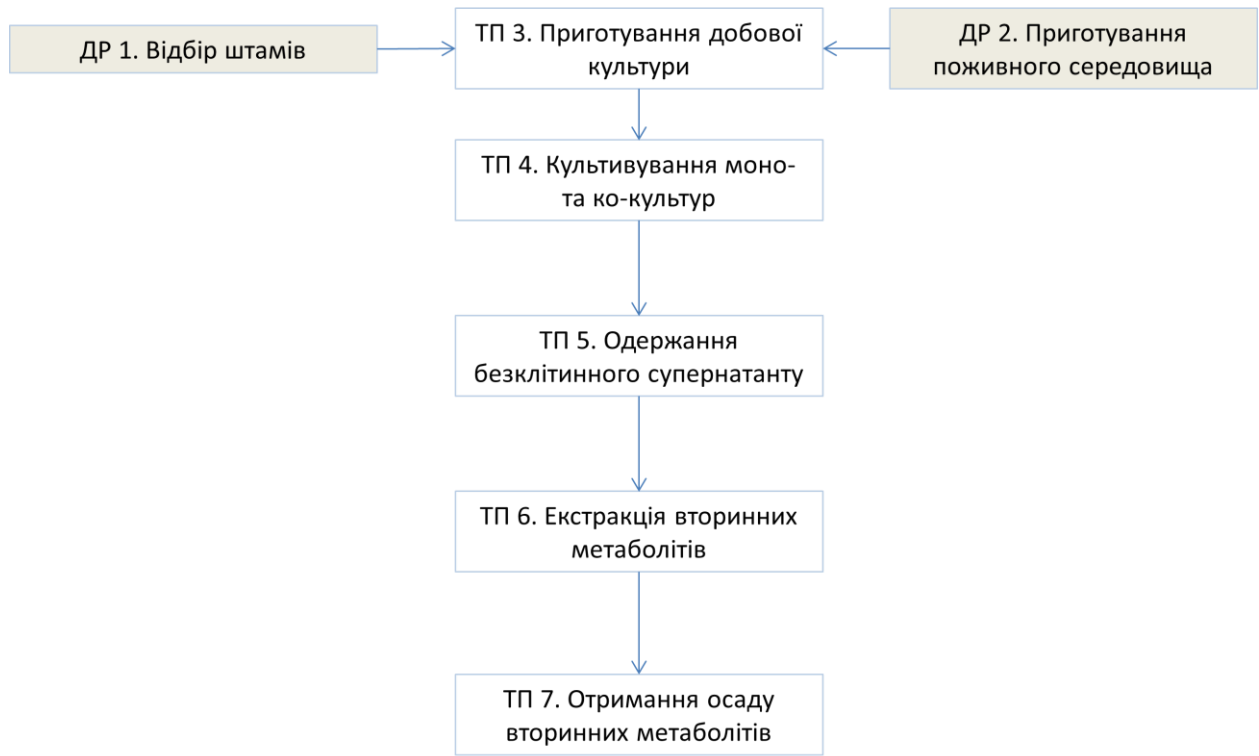


Рис. 6. Стадії технологічної схеми, що були використані у дослідженні: отримання біомаси бактерій.

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

Встановлення можливості стимулювати синтез вторинних метаболітів за рахунок оптимізації складу поживного середовища та культивування у складі консорціумів було проведено з використанням 6 штамів морських бактерій, які у попередніх дослідженнях виявили найбільшу антагоністичну активність серед 45 ізолятів. У табл. 3 наведені результати впливу

модифікацій поживного середовища на синтез вторинних метаболітів монокультурами.

Таблиця 3

Вміст вторинних метаболітів у монокультурах досліджуваних морських бактерій за культивування у різних середовищах

Варіант	Вміст вторинних метаболітів, мг за культивування у різних середовищах		
	Середовище LB	Модифіковане середовище 1	Модифіковане середовище 2
<i>A. faecalis</i>	18,80	20,31	22,75
M1	22,11	24,75	29,4
M3	20,40	20,78	24,07
M4	22,42	25,76	28,22
MC3	32,13	35,63	48,35
MH4	31,38	34,23	40,82

Отримані дані показали, що представники грам-позитивних бактерій (*Bacillus subtilis* MC3 та *Bacillus atrophaeus* MH4) синтезують у порівнянні з грам-негативними в 1,4-1,7 рази більше вторинних метаболітів. Серед грам-негативних бактерій найменша їх кількість зареєстрована у разі *A. faecalis*. За культивування у модифікованому середовищі 1, яке містить у порівнянні з LB додаткові сольові компоненти, зміни у кількості вторинних метаболітів були незначними: вміст цих сполук зростав на 8-12%, або не змінювався (*P. aeruginosa* M3). Приготування поживного середовища на морській воді (модифіковане середовище 2) сприяло більшому підвищенню кількості вторинних метаболітів у монокультурах: на 18-50%. Найбільший приріст спостерігався у штамів бацил (на 30 та 50%) та у *P. aeruginosa* M1. Таким чином, використання морської води є більш ефективним чинником ніж введення до складу поживного середовища додаткових солей.

У табл. 4 та 5 наведені дані щодо впливу на продукцію вторинних метаболітів сумісного культивування представників різних видів бактерій та змін у складі середовища.

Таблиця 4

Вміст вторинних метаболітів у ко-культурах грам-негативних бактерій з
Bacillus subtilis МС3

Варіант ко-культури	Вміст вторинних метаболітів, мг за культивування у різних середовищах		
	Середовище LB	Модифіковане середовище 1	Модифіковане середовище 2
МС3+ <i>A. faecalis</i>	21,63	23,68	26,7
МС3+М1	25,36	30,43	60,03
МС3+М3	23,16	24,13	31,26
МС3+М4	27,43	31,37	51,36

За ко-культивування консорціумів грам-негативних бактерій з *Bacillus subtilis* МС3 у середовищі LB кількість одержаних метаболітів була практично однаковою у всіх варіантах. У модифікованому середовищі 1 вміст вторинних метаболітів був вищим на 10-20%. За культивування у модифікованому середовищі 2 відмічено суттєве збільшення їх кількості, особливо у разі варіантів МС3+М1 та МС3+М4: на 137% та 87%, відповідно.

Такі самі тенденції змін продукції вторинних метаболітів були зафіксовані у консорціумах з *Bacillus atrophoeus* МН4 (табл. 5).

Таблиця 5

Вміст вторинних метаболітів у ко-культурах грам-негативних бактерій з
Bacillus atrophoeus МН4

Варіант ко-культури	Вміст вторинних метаболітів, мг за культивування у різних середовищах		
	Середовище LB	Модифіковане середовище 1	Модифіковане середовище 2
МН4+ <i>A. faecalis</i>	22,14	21,72	28,41
МН4+М1	27,38	34,65	43,38

<i>Продовження таб. 5</i>			
МН4+М3	18,62	21,55	26,73
МН4+М4	28,23	35,35	45,02

У порівнянні з даними табл. 4 приріст виходу вторинних метаболітів у консорціумах зі штамми *P. aeruginosa* М1 та М4, був більшим у модифікованому середовищі 1, але меншим у модифікованому середовищі 2.

Для визначення найбільш ефективних та перспективних варіантів оптимізації синтезу вторинних метаболітів було проведено порівняння очікуваного вмісту вторинних метаболітів з реально визначеним (рис. 7, 8). Оскільки застосування модифікованого середовища 1 виявилось менш ефективним ніж використання модифікованого середовища 2 зіставляли між собою результати, отримані за культивування консорціумів бактерій у середовищах LB, приготованих на дистильованій (контроль) та морській воді.

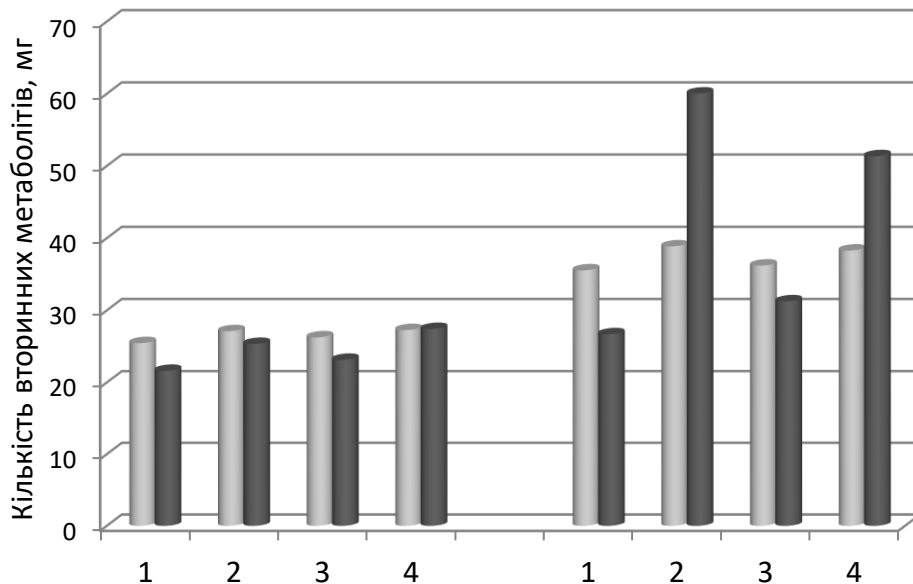


Рис. 7. Порівняння розрахункового та зафіксованого вмісту вторинних метаболітів у ко-культурах грам-негативних бактерій з *B. subtilis* МС3

Примітка: 1 – МС3+*A. faecalis*; 2 – МС3+М1; 3 – МС3+М3; 4 – МС3+М4

Аналіз цих результатів показав, що за вирощування у середовищі на морській воді консорціумів грам-негативних бактерій з *Bacillus subtilis* МС3 як очікуваний так і реальний вміст вторинних метаболітів був вищим. Також слід відмітити, що при застосуванні дистильованої води розбіжностей між цими показниками не було (рис. 7). Дані щодо культивування у середовищі на морській воді однозначно вказують на перспективність консорціумів МС3+М1 та МС3+М4.

Близькі результати продемонстрували і консорціуми тих самих грам-негативних бактерій з *B. atrophoeus* МН4 (рис. 8).

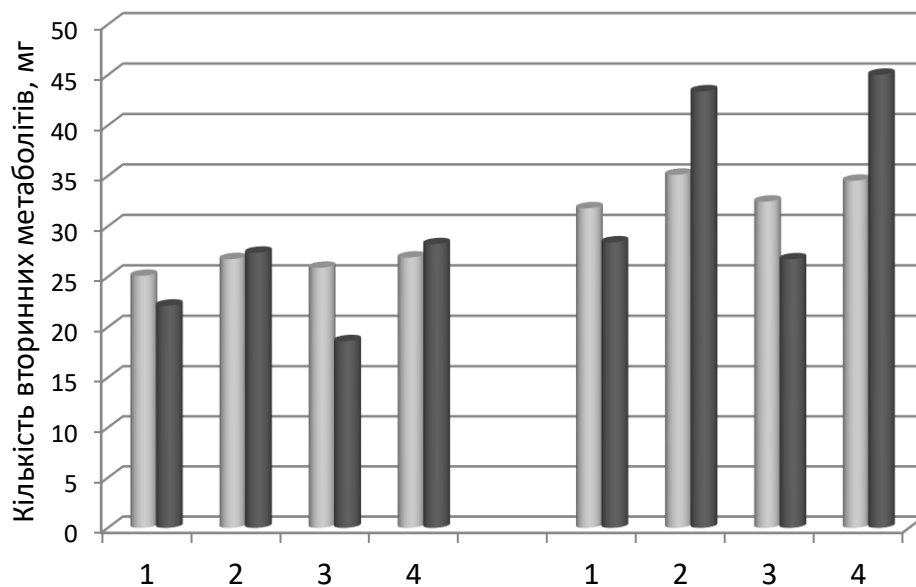


Рис. 8. Порівняння розрахункового та зафіксованого вмісту вторинних метаболітів у ко-культурах грам-негативних бактерій з *B. atrophoeus* МН4

Примітка: 1 – МН4+*A. faecalis*; 2 – МН4+М1; 3 – МН4+М3; 4 – МН4+М4

Таким чином, найбільш ефективними чинниками оптимізації синтезу вторинних метаболітів морських бактерій є їх культивування у складі консорціумів у поживних середовищах на основі морської води.

3.3. Визначення протипухлинної активності вторинних метаболітів

Отримані в ході виконання роботи вторинні метаболіти моно- та ко-культур *Bacillus subtilis* МС3 та *Pseudomonas aeruginosa* М1, одержані за вирощування у середовищі LB з морською водою, були передані на дослідження їх протипухлинної активності науковому співробітнику БННЦ Семенець А.С., яка провела їх у департаменті гастроентерології, гематології та ендокринології Медичної школи (Ганновер, Німеччина).

Дослідження було проведено *in vitro* на культурі клітин гепатоцелюлярної карциноми (НСС). Одержані результати приведені на рис. 8 та 9.

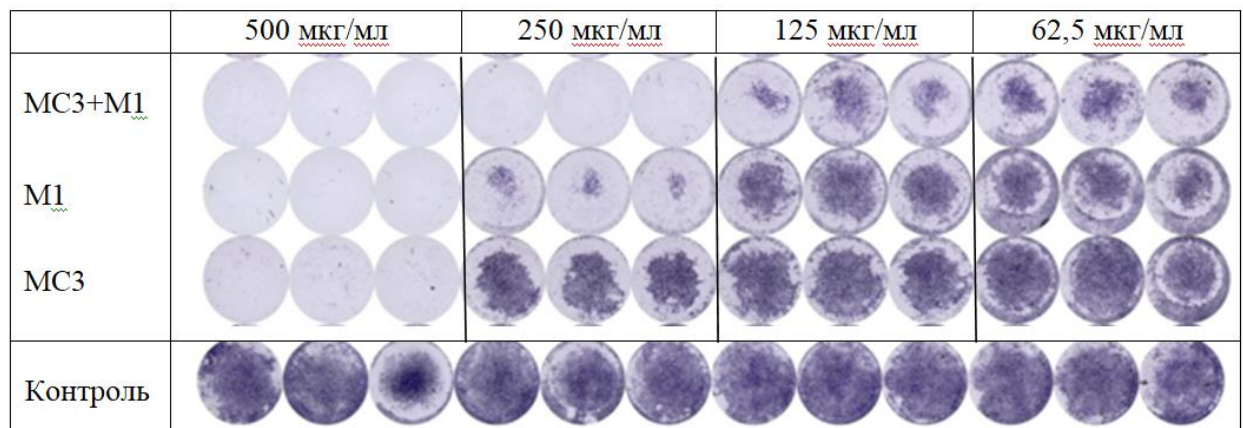


Рис. 8. Ріст клітин НСС у планшетах за впливу вторинних метаболітів моно- та ко-культури *B. subtilis* МС3 та *P. aeruginosa* М1 (48 годин інкубації, забарвлення кристалічним фіолетовим)

Як видно на рисунку, вторинні метаболіти консорціуму МС3+М1 чинять більш значну пригнічувальну дію на ріст пухлинних клітин за усіх досліджених концентрацій. За присутності метаболітів ко-культури у концентраціях 250 та 500 мкг/мл у лунках планшету залишилися лише поодинокі клітини, у той час як метаболіти монокультур вказують таку дію тільки за найбільшої концентрації. Крім того, вторинні метаболіти ко-культури частково пригнічують ріст пухлинних клітин і за концентрацій 62,5

та 125 мкг/мл. Також слід відмітити, що вторинні метаболіти *Pseudomonas aeruginosa* M1 є активнішими за метаболіти *Bacillus subtilis* MC3.

На мікрофотографіях лунок тих самих планшетів видно, що за дії вторинних метаболітів частина пухлинних клітин змінює свою форму, що свідчить про токсичний вплив (рис. 9).

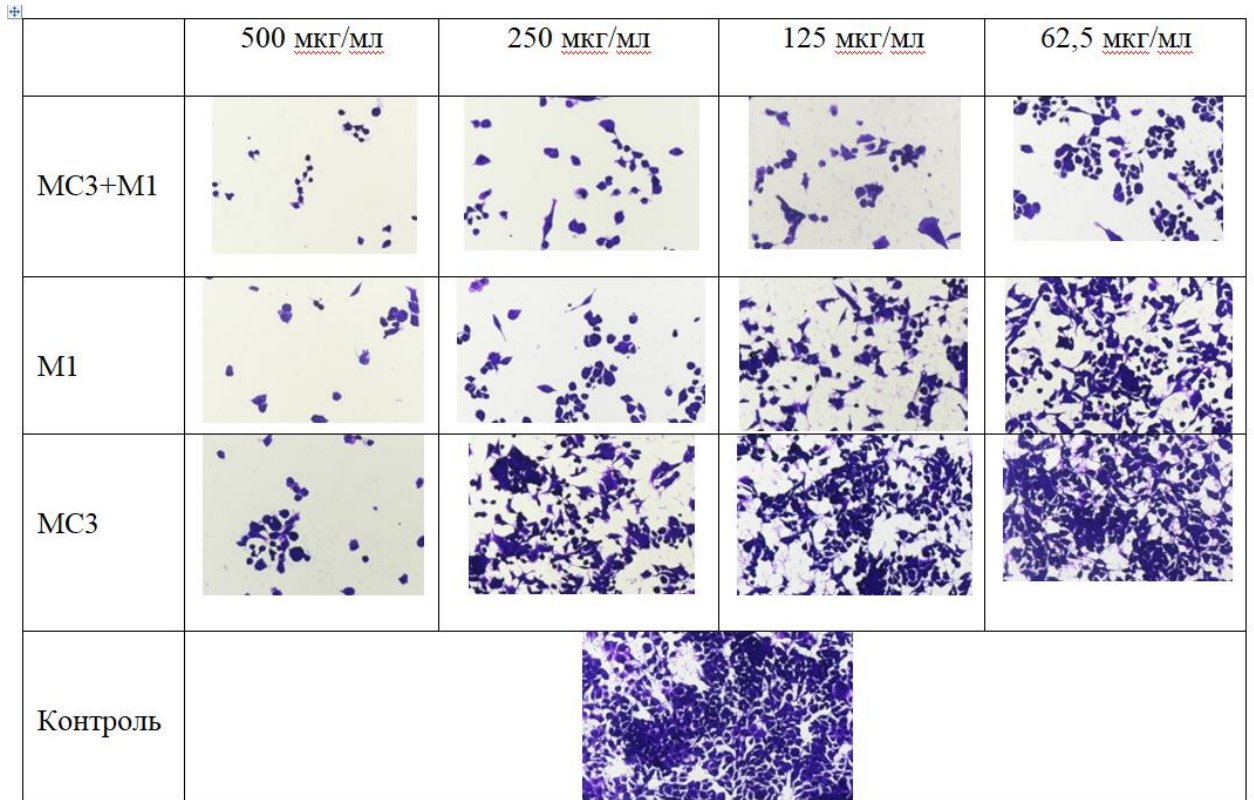


Рис. 9. Мікрофотографі клітин НСС у лунках планшету за впливу вторинних метаболітів моно- та ко-культури *B. subtilis* MC3 та *P. aeruginosa* M1 (Nikon 400)

Таким чином, дослідження протипухлинної активності вторинних метаболітів показало, що за впливу таких чинників, як склад поживного середовища та сумісне культивування, змінюються не тільки кількісні показники, але й біологічна активність екстрактів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Вторинні морських бактерій – це дуже цінний ресурс, який ще треба вивчати та розробляти. У перспективі вони допоможуть вирішити гострі проблеми, з якими зіткнулося людство. Це проблеми забруднення навколишнього середовища, – наприклад, забруднення Світового океану продуктами нафтової промисловості й іншими продуктами господарства людини (пестицидами, важкими металами, поліароматичними сполуками, пластиком), – антибіотична криза і збільшення випадків розвитку злоякісних пухлин серед населення. Серед вторинних метаболітів знайдені біологічні поверхнево активні речовини, які можна використовувати для очищення води і ґрунту.

Багато дослідників [Jeewon et al., 2019; Walsh et al., 2014; Gokulan et al., 1999] вважають, що вторинні метаболіти відкривають нову епоху антибіотиків і протипухлинних препаратів. Проте промислове виробництво цих препаратів уповільнюється неналежними умовами для культивування, неправильно відібраними факторами росту. Широке використання всього багатства вторинних метаболітів морських бактерій потребує подальшого вивчення нових біологічно активних метаболітів, вдосконалення стратегій стимуляції біосинтезу необхідних продуктів та пошуку шляхів оптимізації комерційного виробництва.

Одержані результати свідчать про потенціал консорціумів мікроорганізмів у збільшенні виробництва вторинних метаболітів. Ко-культивування може стимулювати взаємодію різних мікроорганізмів, що призводить до синергетичного ефекту і підвищення кількості біологічно активних сполук. Це може мати практичне значення для отримання нових біологічно активних речовин з морської мікробіоти. Також у даній роботі із застосуванням морської води перевірена можливість використання природних еліситерів для активації мовчазних генів [Stephens, et al. 2019], що

знаходяться у середовищі існування досліджуваних бактерій. Показано, що в результаті цього підвищується кількість синтезованих вторинних метаболітів у разі ко-культивування. Найбільш ефективними у цьому плані виявилися консорціуми штамів *Bacillus* з штамми *P. aeruginosa* M1 та M4.

Згідно з принципом OSMAC: один штам – багато сполук [Romano et al. 2018], одержані грубі екстракти вторинних метаболітів, скоріше за все, містять численні продукти, кожен з яких може проявляти декілька видів біологічної активності. Це підтверджується також даними літератури, щодо складу та біологічної активності вторинних метаболітів представників *Bacillus* та *Pseudomonas* [Abdelaziz, et al. 2022; Iqbal, et al. 2023]. Тому, подальші дослідження отриманих зразків планується зосередити на встановленні їх хімічного складу.

Отже, результати цієї роботи підкреслюють важливість досліджень у галузі біосинтезу вторинних метаболітів морськими бактеріями та вказують на перспективні можливості застосування консорціумів для підвищення виробництва біологічно активних речовин з морського джерела.

ВИСНОВКИ

1. Побудовано технологічну схему виробництва вторинних метаболітів морськими бактеріями *Bacillus* та *Pseudomonas* та їх консорціумами.
2. Одержано 42 зразки вторинних метаболітів досліджуваних морських бактерій.
3. Встановлено, що найбільшу кількість цільових продуктів синтезують консорціуми *B. subtilis* МС3 з *P. aeruginosa* М1 та М4 за присутності у поживному середовищі морської води.
4. Використання синтетичної морської води фактично не впливало на кількість вторинних метаболітів.
5. Оцінка протипухлинної активності вторинних метаболітів монокультур *B. subtilis* МС3 з *P. aeruginosa* М1 та їх консорціуму (МС3+М1) довела, що продукти саме ко-культури володіють найвищою антипроліферативною дією.

СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Галкін Б.М. Біоактивні вторинні метаболіти морських мікроорганізмів : монографія / Б. М. Галкін, Т. О. Філіпова, В. О. Іваниця, Т.В. Гудзенко – Одеса: ОНУ, 2022 – 221 с.
2. Кондрашевська К. Р. Розмаїття мікробних вторинних метаболітів / К. Р. Кондрашевська, І. В. Ключка, Т. П. Пирог, Ю. М. Пенчук // Наукові праці НУХТ. – 2018. – Т. 24, № 5. – С. 44–60.
3. Abdelaziz, A.A. A purified and lyophilized *Pseudomonas aeruginosa* derived pyocyanin induces promising apoptotic and necrotic activities against MCF-7 human breast adenocarcinoma / A.A. Abdelaziz, A.M.A. Kamer, K.B. Al-Monofy et al. // Microb. Cell. Fact – 2022. – V. 21. 262. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01988-x>
4. Alonso S. Tunable decoupled overproduction of lactobionic acid in *Pseudomonas taetrolens* through temperature–control strategies / S. Alonso, M. Rendueles, M. Díaz // Process Biochem. – 2017. – V. 58. – P. 9–16.
5. Andryukov B.G. The Biotechnological Potential of Secondary Metabolites from Marine Bacteria / B.G. Andryukov, V.V. Mikhailov, N.N. Besednova // Marine Science Engineering. – 2019. – V. 7. – P. 176.
6. Buijs Y. Enhancement of antibiotic production by co–cultivation of two antibiotic producing marine *Vibrionaceae* strains / Y. Buijs, S.–D. Zhang, K. M. Jørgensen et al. // FEMS Microbiology Ecology. – 2021. – V. 97, Iss. 4. – P. 1.
7. Candice M. Diversity and Bioactivity of Marine Bacteria Associated with the Sponges *Candidaspongia flabellata* and *Rhopaloeides odorabile* from the Great Barrier Reef in Australia / M. Candice, P. Brinkmann, S. Kearns et al. // Diversity of Marine Invertebrate and Seaweed Symbiotic Bacteria. – 2017. – V. 9. – P. 39.
8. Dashti Y. Actinomycete Metabolome Induction / Suppression with N-Acetylglucosamine / Y. Dashti, T. Grkovic, U. R. Abdelmohsen, et al. // Natural

- Products. – 2017. – V. 80. – P. 828–836.
9. de Felício R. Chemical Elicitors Induce Rare Bioactive Secondary Metabolites in Deep–Sea Bacteria under Laboratory Conditions / R. de Felício, P. Ballone, C. Freitas Bazzano et al. // *Metabolites*. MDPI. – 2021. – V. 11. – P. 107.
 10. Deepika K. V. Marine Microbial Biosurfactants: Ecological and Environmental Applications / K.V. Deepika, G.M. Sheela, P.V. Bramhachari // *Environmental Biotechnology*. – 2021. – V. 3. – P. 221–232.
 11. El–Hawary S. S. New Pim–1 Kinase Inhibitor From the Co–culture of Two Sponge–Associated *Actinomycetes* / S. S. El–Hawary, A. M. Sayed, R. Mohammed, M. A. Khanfar, et al. // *Frontiers in Chemistry*. – 2018. – V. 6. – P. 538.
 12. Foulon V. Colonization of polystyrene microparticles by *Vibrio crassostreae*: light and electron microscopic investigation / V. Foulon, F. Le Roux, L. Christophe et al. // *Environ. Sci. Technol.* ACS Publications. – 2016. – V. 50(20)– P. 10988–10996.
 13. Gokulan K. Production of Secondary Metabolites of Bacteria / K. Gokulan, S. Khare, C. Cerniglia // Elsevier Ltd. – 1999. – V. 2. – P. 1328–1334.
 14. Gomes N. Meroterpenoids from Marine Microorganisms: Potential Scaffolds for New Chemotherapy Leads / N. Gomes, S. Buttachon, A Kijjoa. // *Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin*. Springer. – 2015. – V. 16– P. 323–366.
 15. Goswami D. Plant growth promoting potentials of *Pseudomonas* spp. strain OG isolated from marine water / Goswami D., Vaghela H., Parmar S. et al. // *Journal of Plant Interactions*. – 2013, V. 8 – P. 281–290.
 16. Hailey A. T. Advances in microbial culturing conditions to activate silent biosynthetic gene clusters for novel metabolite production / Hailey A. T., Lorena U., Avena C. R. // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – V. 46. – P. 1381–1400.
 17. Jeewon R. Pharmaceutical Potential of Marine Fungal Endophytes / R. Jeewon, A. B. Luckdun, V. Bhoyroo // *Cham: Endophytes and Secondary Metabolites*. –

2019. – P. 1–21.
18. Jizba J. Stimulation of tetranactin biosynthesis in *Streptomyces griseus* by propionate and phosphate / J. Jizba, M. Hejdukova, E. Prokinova // *Biotechnology Letters*. – 1997. – V. 19. – P. 295–298.
 19. Johnson P. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants / P. Johnson, A. Trybala, V. Starov, V. J. Pinfield // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2021. – V. 78. – P. 2522–2533.
 20. Iqbal S, Begum F, Rabaan AA, Classification and Multifaceted Potential of Secondary Metabolites Produced by *Bacillus subtilis* Group: A Comprehensive Review. / S. Iqbal, F. Begum, A.A. Rabaan, et al. // *Molecules*. 2023; 28(3):927. <https://doi.org/10.3390/molecules28030927>
 21. Marmann A. Co–Cultivation. A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms / Marmann A., Amal H. A., Wenhan L., et al. // *Mar. Drugs*. MDPI. – 2014. – V. 12(2). – P. 1043–1065.
 22. Mart'yanov S.V. Stimulation of Violacein Biosynthesis in *Chromobacterium violaceum* Biofilms in the Presence of Dimethyl Sulfoxide / S. V. Mart'yanov, A.V. Letarov, P.A. Ivanov, et al. // *Microbiology*. – 2018. – V. 87. – P. 437–440.
 23. Moore J. M. Use and Discovery of Chemical Elicitors That Stimulate Biosynthetic Gene Clusters in *Streptomyces* Bacteria / J. M. Moore, E. Bradshaw, R. F. Seipke // *Methods in Enzymology*. – 2012. – V. 8. – P. 517.
 24. Nadarajan V. An Analysis of Biosynthesis Gene Clusters and Bioactivity of Marine Bacterial Symbionts / V. Nadarajan, S. Mary, J. Punitha, et al. // *Current Microbiology*. – 2021. – V. 3. – P. 2522–2533.
 25. Nelson G. M. Meroterpenoids from Marine Microorganisms: Potential Scaffolds for New Chemotherapy Leads / G. M. Nelson, S. Gomes, A. Kijjoa, B. Kijjoa // *Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin*. Springer. – 2014. – V. 16. – P. 323–366.
 26. Oh D. –C. Induced production of emericellamides A and B from the marine–derived fungus *Emericella* sp. in competing co–culture. / D. –C. Oh, C.A.

- Kauffman, P.R. Jensen, W. Fenical // *J. Nat. Prod.* – 2007. – V. 70. – P. 515–520.
27. Palazzotto E. Omics and multi-omics approaches to study the biosynthesis of secondary metabolites in microorganisms / E. Palazzotto, T. Weber // *Current Opinion in Microbiology.* – 2018. – V. 45. – P. 109–116.
28. Park H. B. Glionitrin A an antibiotic-antitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes / H. B. Park, H. C. Kwon, C. –H. Lee, H. O. Yang // *J. Nat. Prod.* – 2009. – V. 72. – P. 248–252.
29. Pospisil S. Stimulation of monensin biosynthesis in *Streptomyces cinnamomensis* by antioxidants butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene / S. Pospisil and P. Sedmera // *Biotechnology Letters.* – 1998. – V. 20(5). – P. 519–523.
30. Rateb M. E. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture / Rateb M. E., Hallyburton I., Houssen W. E., et al. // *RSC Advances.* – 2013. – V. 3. – P. 14444–14450.
31. Romano S. Extending the “One Strain Many Compounds” (OSMAC) Principle to Marine Microorganisms / S. Romano, S.A. Jackson, S. Patry, A.D.W. Dobson // *Mar. Drugs.* – 2018. – V. 16. 244; doi:10.3390/md16070244
32. Seyedsayamdost M. R. High-throughput platform for the discovery of elicitors of silent bacterial gene clusters / M. R. Seyedsayamdost // *PNAS.* – 2014. – V. 20. – P. 111.
33. Shu C.–H. Effects of light intensity and wavelength on the production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas taetrolens* in batch cultures: effects of light intensity and wavelength on the production of lactobionic acid / C. –H. Shu, K. Tseng, R. Jaiswal // *J Chem. Technol Biotechnol.* – 2018. – V. 93. – P. 1595–1600.
34. Slattery M. Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis* / M. Slattery, I. Rajbhandari, K. Wesson // *Microb. Ecol.* – 2001. – V. 41. – P. 90–96.

35. Snyder R. V. Polyketide synthase genes from marine dinoflagellates / R. V. Snyder, P. D. Gibbs, A. Palacios, L. Abiy, et al. // *Marine Biotechnology*. – 2003. – V. 5(1). – P. 1–12.
36. Stephens K. Bacterial co-culture with cell signaling translator and growth controller modules for autonomously regulated culture composition / K. Stephens, M. Pozo, C.Y. Tsao, et al. // *Nat. Commun.* –2019. – V. 10. 4129. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12027-6>
37. Timmermans M. L. Culturing marine bacteria from the genus *Pseudoalteromonas* on a cotton scaffold alters secondary metabolite production / Timmermans M. L., Picott K. J., Ucciferri L. et al. // *MicrobiologyOpen*. – 2019. – V. 8. – P. 5.
38. Trischman J. A. Competitive induction and enhancement of indole and a diketopiperazine in marine bacteria / J. A. Trischman, R. E. Oeffner, M. G. de Luna, M. Kazaoka// *Mar. Biotechnol.* – 2004. – V. 6. – P. 215–220.
39. Voser T. M. How different are marine microbial natural products compared to their terrestrial counterparts? / T. M. Voser, M. D. Campbell, A. R. Carroll // *Nat. Prod. Rep. Royal society of chemistry*. – 2020. – V. 39. – P. 7–19.
40. Walsh C. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered / C. Walsh, T. Wencewicz // *Antibiotics*. – 2014. – V. 67. – P. 7–22.
41. Zeng Z. Biofilm formation and heat stress induce pyomelanin production in deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 / Z. Zeng, X. Cai, P. Wang et al. // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8. – P. 1822.
42. Zhang C. Discovery of a Cryptic Depsipeptide from *Streptomyces ghanaensis* via MALDI-MS-Guided High-Throughput Elicitor Screening / Zhang C., M. R. Seyedsayamdost // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2020. – V. 59. – P. 23005–23009.
43. Zhou J. NMR-based metabolomics reveals the metabolite profiles of *Vibrio parahaemolyticus* under ferric iron stimulation / J. Zhou, D. Lu, C. Zhang, et al. // *J. Microbiol.* – 2017. – V. 55. – P. 628–634.
44. Zhu F. A new antibacterial alkaloid produced by mixed fermentation of two

marine-derived mangrove epiphytic fungi / F. Zhu, G. Chen, X. Chen, M. Huang, et al. // Chem. Nat. Compd. – 2011. – V. 47. – P. 767–769.

45. <https://bacmedia.dsmz.de/medium/123>