

UDC 579.222.6

М.Д. Штеніков, А.М. Остапчук, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: shtenikovnik@gmail.com

СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ, АМІНОКИСЛОТ ТА МОНОСАХАРИДІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *VACILLUS*, ВИДІЛЕНИХ З ДОННИХ ВІДКЛАДЕНЬ ЧОРНОГО МОРЯ

Метою роботи було визначити кількісний та якісний склад жирних кислот, амінокислот та моносахаридів антагоністично активних споротвірних бактерій роду *Bacillus*, ізольованих з глибоководних донних відкладень Чорного моря. **Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження були антагоністично активні бактерії *Bacillus velezensis* ONU 553, *Bacillus pumilus* ONU 554, *Bacillus subtilis* ONU 559, *Bacillus megaterium* 11, *Bacillus pumilus* 95. Склад жирних кислот визначали на газовому хроматографі з полум'яно-йонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США), моноцукридів – методом газо-рідинної хромато-мас-спектрометрії на Agilent 6890N/5973 inert (Agilent Technologies, USA), амінокислот – на рідинному хроматографі Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA). **Результати.** Виявлено характерні для досліджених штамів жирні кислоти: для штаму *B. velezensis* ONU 553 – 17:0, 14:0 anteiso, 11:0 2OH, для *B. subtilis* ONU 559 – 19:0 iso, 19:0 anteiso, для *B. megaterium* 11 – 15:0 2OH, *B. pumilus* 95 – 15:1 iso w5c та 12:0. Амінокислотні патерни досліджених штамів не демонструють значущу кореляцію з патерном біоти океану, а штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. pumilus* 95 характерні для біоти піщаних ґрунтів. Крім характерних для бактерій групи *B. subtilis* моносахаридів виявлена арабіноза, багатоамтоні спирти – L-ідітол та міоїнозитол, функції яких у клітинах бацил не відомі. **Висновки.** Показники HAI та a15/i15 штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 характерні для мезофільних бактерій, а *B. megaterium* 11 та *B. pumilus* 95 – для помірних термофілів. Результати досліджень підтримують гіпотезу про неавтохтонність досліджуваних бактерій для глибоководних донних відкладень Чорного моря.

Ключові слова: *Bacillus*, Чорне море, донні відкладення, жирні кислоти, амінокислоти, моносахариди.

Представники роду *Bacillus* являють собою об'єкт активного дослідження з самого зародження мікробіології як науки [9]. Це пов'язано як з різноманітністю екологічних ніш, які вони займають (від різних форм паразитизму до коменсалізму та мутуалізму), специфічною будовою (здатність до утворення ендоспор) та здатністю до синтезу широкого спектру біологічно активних вторинних метаболітів у тому числі антибіотиків [10, 12]. До антимикробних



сполук належать нерибосомні пептиди родин сурфактинів, ітуринів, фенгіцинів та курстакінів, аміноглікозидні антибіотики (бутирозин, неотрегалозодіамін) тощо [16]. Біосинтетичний потенціал бацил морського походження поки лишається мало вивченим. Є всі підстави очікувати розширення наших знань про біосинтетичний потенціал бацил саме завдяки морським штамам. Так, у представників роду *Bacillus* морського походження було виявлено антибіотики пептидної природи ряду нових класів (маріхізини, гагеостатини, бацилітетрини) та незвичайно модифіковані сполуки раніше відомих класів (наприклад, глікозильований макролактин W) [8].

Інформація про первинні метаболіти, такі як амінокислотний та вуглеводний склад, в літературі представлена значно менше і для ряду груп взагалі відсутня, не зважаючи на важливість таких даних як з погляду цитофізіології, так і потенціалу штамів як пробіотиків, що актуально зокрема і для бацил [9]. Ці показники характеризують дуже важливі для клітинної фізіології молекули – білки та поліцукриди, що робить їх також одним з інструментів поліфазного таксономічного аналізу [13].

У попередніх дослідженнях з глибоководних донних відкладень Чорного моря було ізольовано більше 100 штамів споротвірних факультативно-анаеробних бактерій, визначено їх таксономічний склад та антагоністичну активність до широкого спектру тест штамів [1, 15].

Метою роботи було проаналізувати кількісний та якісний склад жирних кислот, амінокислот та вуглеводів антагоністично активних споротвірних бактерій роду *Bacillus*, ізольованих з глибоководних донних відкладень Чорного моря.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були антагоністично активні бактерії *Bacillus subtilis* ONU 553, *Bacillus megaterium* *Bacillus megaterium* ONU 554, *Bacillus* 559, *Bacillus megaterium* 11, *Bacillus pumilus* 95, відібрані з колекції споротвірних факультативно-анаеробних бактерій, ізольованих з глибоководних донних відкладень Чорного моря [1]. Бактерії підтримували на середовищі Nutrient agar (Himedia).

Для досліджень використовували добову культуру, яку двічі пересівали на щільному живильному середовищі Tryptic Soy Agar (TSA). Визначення жирнокислотних спектрів (далі – ЖК-спектрів) виконували методом газової хроматографії, за стандартною методикою [14] з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-йонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США). Розділення проводили на капілярній колонці 30м×0,25мм×0,25мкм Ultra 2, швидкість потоку 3 мл/хв, газ-носіє водень, градієнт температури від 150 °C до 300 °C впродовж 6 хв.

Для визначення загального складу моносахаридів до зразку бактеріальної біомаси об'ємом у дві бактеріологічні петлі додавали 2 мл 2М трифтороцтової кислоти [7]. Гідроліз проводили при 100 °C впродовж 6 год. Гідролізат упарювали, промивали водою для видалення кислоти. Для отримання альдонітрильних похідних моносахаридів до екстракту додавали дериватизу-



вальну суміш (гідроксиламін солянокислий у метанолі). Розчинений екстракт витримували впродовж 25 хв при 75 °С. Після ацетилювання до реакційної суміші додавали 1 мл дихлорметану. Дихлорметановий шар відбирали, висушували досуха та розчиняли в 300 мкл суміші гептан/етилацетат (1:1 v/v).

Моносахариди визначали методом газо-рідинної хромато-мас-спектрометрії на системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent technologies, USA), колонка капілярна HP-5ms (30m×0,25mm×0,25mkm). Температура випаровувача 250 °С, температура інтерфейсу 280 °С. Розділення проводили в режимі програмування температури – початкову температуру 160 °С витримували впродовж 8 хв, піднімали з градієнтом 5 °С/хв до 240 °С. Кінцеву температуру витримували впродовж 6 хв. Пробу об'ємом 1 мкл, вводили в режимі поділу потоку 1:50. Детектування проводили в режимі SCAN в діапазоні (38–400 m/z). Швидкість потоку газу носія через колонку 1,2 мл/хв. Ідентифікацію проводили за часом утримання стандартів моносахаридів та з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02. Кількісний аналіз проводили шляхом додавання розчину внутрішнього стандарту в досліджувані проби. Як внутрішній стандарт використовували розчин сорбітолу.

Для визначення загальної кількості амінокислот дві бактеріологічні петлі бактеріальної біомаси вносили до віали, додавали 2 мл водного розчину 6N соляної кислоти та поміщали в термостат при 110 °С [6]. Гідроліз проводили впродовж 24 год. Після чого 0,5 мл відцентрифугованого екстракту/гідролізату упарювали на роторному випаровувачі, тричі промиваючи дистильованою водою для видалення соляної кислоти. Ресуспендували в 0,5 мл дистильованої води та фільтрували крізь мембранні фільтри з регенованої целюлози з порами 0,2 мкм. Отримання флуоресцентних похідних проводили в автоматичному програмованому режимі перед введенням проби в хроматографічну колонку з використанням ОРА (orthophthalaldehyde) та FMOC (9-fluorenylmethyl chloroformate). Ідентифікацію амінокислот проводили шляхом порівняння часу утримання з стандартною сумішшю амінокислот (Agilent 5061-3334). Кількісна оцінка рангової кореляції між рядами спадання вмісту для амінокислот була виконана з використанням тесту Кендела, реалізованого в бібліотеці ScyPy мови програмування Python [2, 17].

Результати та їх обговорення

Отримані дані свідчать про те, що спектри жирних кислот досліджених штамів в цілому демонструють риси, характерні для представників роду *Bacillus* та групи видів *Bacillus subtilis*, зокрема. До даної групи, окрім вищезазначеного, входять такі види, як *Bacillus megaterium*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. amiloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. mojavensis* тощо [9, 10]. Багато штамів даної групи є продуцентами різноманітних біологічно активних речовин, зокрема антибіотиків та бактеріоцинів. До ознак першої групи належить характерне для представників роду *Bacillus* переважання розгалужених жирних кислот із довжиною вуглецевого ланцюга від 14 до 17 атомів (табл. 1). До властивостей ЖК-спектрів, характерних для групи *Bacillus subtilis* входить різке переважання насичених жирних кислот над ненасиченими, яке наближається до 100% в деяких випадках, значення індексу теплової адаптації (heat



adaptation index – далі HAI), близькі до одиниці та значення a15/i15 між 1,0 та 3,0 [3]. Ознаки останньої групи були у випадку досліджених штамів проявлені так само чітко, як це зазвичай характерно для групи *Bacillus subtilis*. Ця обставина стане нижче предметом обговорення. Підрахунок HAI виконували за формулою [3]:

$$\text{HAI} = \frac{(n14:0) + p(n16:0) + p(i14:0) + p(i15:0) + p(i16:0) + p(i17:0)}{p(a15:0) + p(a17:0) + p(n16:1) + p(i17:1 (n - 10)) + p(16:1 \omega 7c \text{ alcohol})}$$

де р є часткою певної жирної кислоти.

Значення sim-індексів, що вказують на подібність отриманого жирно-кислотного спектру для такого у типового штаму даного виду, визначеного за стандартною методикою, для штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* 559, виявилися досить високими для видової ідентифікації, тобто більшими за 0,500. Відповідні значення для *B. megaterium* 11 та *B. pumilus* 95 такої ідентифікації виконати не дозволяють через низьке значення різниці між альтернативними індексами (штам 11) чи значення менше за 0,5 (штам 95) (табл. 1). Підкреслимо, що формально індекси цих штамів є задовільними для видової ідентифікації як такої згідно з керівництвом виробника, але різниця між їх значеннями та запропонованими альтернативними індексами не перевищує 0,1. Значення Sim-індексу штаму *B. pumilus* 95 може вказувати на нетиповість даного штаму для виду *Bacillus pumilus*.

Показники HAI та a15/i15, що є оцінкою термофільності даного штаму і були розроблені саме для представників роду *Bacillus*, були розраховані за формулами, запропонованими Diomandé et al. [3]. Їх значення інтерпретуються таким чином: якщо HAI штаму приймає значення близьке до одиниці, то штам мезофільний; якщо він більший чи менший, то, штам ідентифікується, відповідно, як термофільний та психрофільний. Аналогічно визначається коефіцієнт a15/i15: мезофільні штами мають значення між 1 та 3, термофільні та психрофільні – менші за 1 та більші за 3, відповідно.

Інтерпретуючи в такому ключі отримані дані, можна дійти висновку, що показники HAI та a15/i15 штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 характерні для мезофільних бактерій, а *B. megaterium* 11 та *B. pumilus* 95 демонструють набір ознак, характерних для помірних термофілів, тобто відносно високі значення HAI та низькі a15/i15 [3]. Температурні діапазони росту для досліджуваних штамів не визначалися, проте всі вони демонстрували задовільний ріст за інкубації при 30 °C.

Також можна відзначити унікальні для кожного зі штамів жирні кислоти – для штаму *B. velezensis* ONU 553 це 17:0, 14:0 anteiso, 11:0 2OH. Для штаму *B. pumilus* 554 таких жирних кислот не виявлено, для *B. subtilis* ONU 559 такими є 19:0 iso, 19:0 anteiso, для *B. megaterium* 11 – 15:0 2OH і, відповідно, *B. pumilus* 95 – 15:1 isow5c та 12:0.

Порядок виявлених амінокислот по зниженню масової долі майже незмінний (табл. 2).



Таблиця 1

Спектри жирних кислот бактерій роду *Bacillus*, ізольованих з Чорного моря

Table 1

Spectra of fatty acids of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from the Black Sea

Жирна кислота	<i>Bacillus subtilis</i> ONU 553	<i>Bacillus pumilus</i> ONU 554	<i>Bacillus subtilis</i> ONU 559	<i>Bacillus megaterium</i> 11	<i>Bacillus pumilus</i> 95
Sim-індекс	0,812	0,655	0,846	0,516	0,484
15:0 anteiso	37,16	42,69	36,5	34,66	36,29
15:0 iso	25,47	42,89	22,75	45,8	41,16
17:0 iso	10,16	2,09	13,79	5,17	5,18
17:0 anteiso	8,6	4,81	12,95	6,16	7,41
16:00	3,81	0,9	2,19	1,38	1,27
16:0 iso	2,97	1,59	2,89	2	2,08
17:1 iso w10c	1,96	0,41	2,05	1,28	0,95
16:1 w11c	1,63	0,33	0,88	0,52	0,36
17:1 iso w5c	1,46	0,64	0	0	0,56
15:1 iso w5c	0	0	0	0	0,49
15:0 2OH	0	0	0	0,05	0
14:0 iso	1,22	0,7	0,8	0,69	0,64
14:00	0,91	0,49	0,3	0,39	0,45
16:1 w7c alcohol	0,7	0,35	0,59	0,5	0,43
17:00	0,64	0	0	0	0
13:0 anteiso	0,36	0	0	0,04	0,45
14:0 anteiso	0,27	0	0	0	0
11:0 2OH	0,24	0	0	0	0
15:1 w5c	1,46	0,53	0,49	0	0
13:0 anteiso	0	0,43	0,16	0	0
13:0 iso	0	0,4	0,13	0,29	0,38
15:0 iso 3OH	0	0,23	0	0,14	0,19
18:00	0	0	0,79	0	0,59
17:0 iso 3OH	0	0	0,2	0,12	0,15
19:0 iso	0	0	0,3	0	0
19:0 anteiso	0	0	0,17	0	0
17:0 2OH	0	0	0,14	0,08	0,12
12:00	0	0	0	0	0,14
17:1 iso I/anteiso B	0,99	0,52	1,91	0,73	0,72
% C:15	0,63	0,86	0,59	0,80	0,77
% насичених ЖК	91,8	97,22	94,08	96,97	96,98
a15/i15	1,46	0,995	1,60	0,76	0,88
HA1	0,89	1,00	0,81	1,29	1,12
SIM-індекс 1	0.812	0,655	0,846	0,516	0,484
SIM-індекс 2	-	0,607	-	0,443	0,445



Таблиця 2

Амінокислотний склад бактерій роду *Bacillus*, ізольованих з Чорного моря

Table 2

Amino acid composition of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from the Black Sea

<i>Bacillus velezensis</i> ONU 553	% від загальної суми площ піків	<i>Bacillus pumilus</i> ONU 554	% від загальної суми площ піків	<i>Bacillus subtilis</i> ONU 559	% від загальної суми площ піків	<i>Bacillus megaterium</i> 11	% від загальної суми площ піків	<i>Bacillus pumilus</i> 95	% від загальної суми площ піків
L-Arg	18,12	Gly	19,83	L-Arg	17,67	Gly	16,07	Gly	19,64
Gly	17,21	L-Arg	16,61	Gly	17,53	L-Arg	14,23	L-Arg	18,34
L-Glu	13,25	L-Leu	9,73	L-Glu	10,24	L-Pro	12,72	L-Leu	11,09
L-Leu	7,29	L-Glu	9,65	L-Ala	8,40	L-Glu	11,62	L-Glu	9,65
L-Ala	7,21	L-Ala	7,03	L-Leu	7,91	L-Leu	9,16	L-Ala	7,82
L-Pro	6,83	L-Iso	6,43	L-His	6,56	L-Ala	8,46	L-Iso	5,90
L-Iso	6,62	L-His	5,97	L-Iso	6,35	L-Iso	7,08	L-Pro	5,77
L-Tyr	4,88	L-Tyr	4,68	L-Tyr	4,89	L-Tyr	5,34	L-Phe	4,24
L-His	4,62	L-Pro	4,39	L-Pro	4,81	L-Phe	5,18	L-Tyr	4,04
L-Phe	3,94	L-Phe	4,09	L-Phe	3,92	L-Val	4,03	L-His	3,41
L-Ser	3,25	L-Ser	3,28	L-Ser	3,17	L-Ser	3,09	L-Ser	3,20
L-Val	3,12	L-Val	2,85	L-Val	2,86	L-Asp	3,02	L-Val	3,03
L-Asp	2,30	L-Asp	2,31	L-Asp	2,57	L-His	-	L-Asp	2,13
L-Thr	1,35	L-Thr	1,58	L-Met	1,71	L-Thr	-	L-Thr	1,75
L-Met	-	L-Met	1,57	L-Thr	1,42	L-Met	-	L-Met	-
L-Lys	-	L-Lys	-	L-Lys	-	L-Lys	-	L-Lys	-

В роботі Moura et al. [11] запропоновано цікавий метод аналізу амінокислотного складу для організмів різних біологічних ніш. Авторам вдалося виявити, що за розташування амінокислот за зниженням вмісту, організми різних біотопів демонструють певні сигнатури чи патерни чергування амінокислот у таких спектрах. Аналіз отриманих нами даних не виявив однозначної відповідності з жодним із запропонованих Moura патернів. Спостерігається певне наближення до інвертованого патерну, характерного для біоти піщаних ґрунтів (по зростанню кількості: аргінін-лізін-лейцин-аланін-аспарагін/аспартат), що може мати відношення до вихідного місця походження даних штамів. Також спостерігається, що компоненти патерну, характерного для організмів океану, групуються на початку відповідних переліків амінокислот, практично не відтворюючи досить цікавий саме в даному випадку мотив (по зростанню: аланін-триптофан-гліцин-глутамін/глутамат-лейцин).

Для об'єктивного порівняння порядків було використано тест рангової кореляції Кендела. Результати обрахування даного показника наведено у табл. 3.



Таблиця 3

Коефіцієнт рангової кореляції Кендела для наборів амінокислот дослідних штамів

Table 3

Kendall rank correlation coefficient values for the sets of amino acids of the studied strains

Штам	А		В	
	τ	p-value	τ	p-value
<i>B. velezensis</i> ONU 553	0,544	0,01	0,128	0,542
<i>B. pumilus</i> ONU 554	0,544	0,01	0,032	0,879
<i>B. subtilis</i> ONU 559	0,384	0,067	0,032	0,879
<i>B. megaterium</i> 11	0,224	0,286	-0,416	0,048
<i>B. pumilus</i> 95	0,544	0,01	0,096	0,648

Примітка: Порівняння проведено за даними амінокислотного пулу: А – біоти піщаних ґрунтів [11], В – з даними біоти океану [11], τ – коефіцієнт кореляції Кендела. Значення τ вважається за значуще, якщо відповідне значення p-value менше за 0,05.

Note: comparison was conducted with the data of amino acid pool: А – of sandy soils biota [11], В – ocean biota data [11], τ – Kendall rank correlation coefficient. τ value considered meaningful, if corresponding p-value is less than 0.05.

Амінокислотні патерни штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. pumilus* 95 демонструють значущу і пряму кореляцію з відповідним патерном біоти піщаних ґрунтів, в той час як їх кореляція з патерном океанічної біоти слабка і незначуща. Це можна інтерпретувати як свідчення на користь походження досліджуваних штамів з піщаних пляжів узбережжя Чорного моря.

Патерн штаму *B. megaterium* 11 демонструє обернену та значущу кореляцію з патерном біоти океану і не демонструє переконливої кореляції з патерном пісків. Такий результат важко піддається інтерпретації. Те ж стосується штаму *B. subtilis* ONU 559, патерн якого не корелює з жодним з запропонованих.

Вміст моносахаридів для досліджених бактерій носить в цілому очікуваний характер (табл. 4). Рибоза входить до складу РНК та у низки представників *Bacillus subtilis* до тейхоевих кислот, і цілком природно припустити її наявність у тій самій ролі у клітинних стінках штамів філогенетично близьких видів. Рамноза для бацил відома лише у складі ендоспор та її наявність у зразках усіх штамів, окрім *B. velezensis* ONU 553, може свідчити про початок процесу ендоспороутворення у бактерій. Цікавою в цьому контексті є відсутність рідкісного моносахариду хіновози, характерного для ендоспор *B. subtilis* та вегетативних форм деяких штамів цього виду [18]

Велика кількість глюкози зрозуміла з позицій її ролі в енергетичному обміні прокариот та зокрема фірмікут. Високий вміст галактози відомий для *Bacillus anthracis*, що відрізняє даний вид навіть з досить однорідної групи *B. cereus*. У невеликих кількостях, менших приблизно на два порядки за від-



повідні значення для глюкози, галактоза також давно відома як компонент клітин *Bacillus subtilis*, проте її точна локалізація та функція в клітині невідомі [18]. Арабіноза не відома як компонент клітин бацил та взагалі фірмікут. Серед прокариот вони відомі лише для актинобактерій як компоненти арабіногалактану [4, 5].

Таблиця 4

Склад маносахаридів бактерій роду *Bacillus*,
ізольованих з Чорного моря (% від загальної суми площ піків)

Table 4

Manosaccharide composition of bacteria of the genus *Bacillus*
isolated from the Black Sea (in % of the total peak area)

Моноцукрид	<i>Bacillus subtilis</i> ONU 553	<i>Bacillus pumilus</i> ONU 554	<i>Bacillus subtilis</i> ONU 559	<i>Bacillus megaterium</i> 11	<i>Bacillus pumilus</i> 95
Арабіноза	3,8210	4,8189	1,8306	1,2370	5,3184
Галактоза	2,6950	4,0278	5,7860	7,1885	3,9411
Глюкоза	53,7670	6,7654	37,0567	34,2136	8,4826
Рамноза	0	17,4851	1,7592	2,0270	12,3244
Рибоза	6,7820	0	1,1844	1,3568	3,3746
L-ідітол	5,7000	9,5021	8,2531	7,9936	12,6218
Міоїнозитол	0	3,6773	3,3938	2,2432	5,1889

У досліджених штамів виявлені також два багатоамтонних спирти – L-ідітол (у всіх штамів) та міоїнозитол (у всіх штамів, окрім *B. velezensis* ONU 553), у штаму *B. subtilis* ONU 559 – редукувальний дисахарид туранозу, у штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. pumilus* ONU 554 – глікозидсалірепін, а у штаму *B. megaterium* 11 – алкалоїд солазодин, однак ці результати потребують подальшого дослідження та аналізу.

Отже, можна зробити висновок, що за показниками HAI та a15/i15 штами *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 можуть бути віднесені до мезофільних бактерій, а *B. megaterium* 11 та *B. pumilus* 95 – до помірних термофілів. Ці дані та характеристика амінокислотних спектрів досліджених штамів підтримують гіпотезу про алохтонність досліджуваних штамів для глибоководних донних відкладень Чорного моря.

Роботи з використанням хроматографічного обладнання були проведені в Центрі колективного користування унікальним науковим обладнанням при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ, при технічному та методичному сприянні к.б.н. Хархоти Максима Андрійовича, за що висловлюємо йому щирі вдячність.



Н.Д. Штеніков, А.Н. Остапчук, В.О. Іваниця

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, АМИНОКИСЛОТ И МОНОСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОННЫХ ОСАДКОВ ЧОРНОГО МОРЯ

Реферат

Целью работы было определить количественный и качественный состав жирных кислот, аминокислот и углеводов антагонистически активных спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, изолированных из глубоководных донных осадков Черного моря. **Материалы и методы.** Объектом исследования были бактерии *Bacillus velezensis* ONU 553, *Bacillus pumilus* ONU 554, *Bacillus subtilis* ONU 559, *Bacillus megaterium* 11, *Bacillus pumilus* 95. Состав жирных кислот определяли на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США), моносахаридов – методом газо-жидкостной хромато-мас-спектрометрии на Agilent 6890N/5973 inert (Agilent Technologies, USA), аминокислот – на жидкостном хроматографе Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA). **Результаты.** Обнаружены характерные для исследованных штаммов жирные кислоты: для штамма *B. velezensis* ONU 553 – 17:0, 14:0 anteiso, 11:0 2OH, для *B. subtilis* ONU 559 – 19:0 iso, 19:0 anteiso, для *B. megaterium* 11 – 15:0 2OH, *B. pumilus* 95 – 15:1 isow5c и 12:0. Аминокислотные паттерны исследованных штаммов не демонстрируют значимой корреляции с паттерном биоты океана, а у штаммов *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 и *B. pumilus* 95 характерны для биоты песчаных грунтов. Кроме характерных для бактерий группы *B. subtilis* углеводов обнаружена арабиноза, многоатомные спирты – L-идитол и миоинозитол, функции которых в клетках бацилл неизвестны. **Выводы.** Показатели HAI и a15/i15 штаммов *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 и *B. subtilis* ONU 559 характерны для умеренно мезофильных бактерий, а *B. megaterium* 11 и *B. pumilus* 95 – для умеренных термофилов. Результаты исследований поддерживают гипотезу о неавтотонности исследуемых бактерий для глубоководных донных осадков Черного моря.

Ключевые слова: *Bacillus*, Черное море, донные отложения, жирные кислоты, аминокислоты, моносахариды.



M.D. Shtenikov, A.M. Ostapchuk, V.O. Ivanytsia

Odesa National University after I. I. Mechnikov,
2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine

COMPOSITION OF FATTY ACIDS, AMINO ACIDS AND MONOSACCHARIDES OF BACILLUS GENUS BACTERIA ISOLATED FROM THE BLACK SEA BOTTOM SEDIMENTS

Summary

The aim of this work was to determine the quantitative and qualitative composition of fatty acids, amino acids and, carbohydrates of antagonistically active sporeforming *Bacillus* genus bacteria isolated from the deep-sea sediments of the Black Sea. **Materials and methods.** The object of the study was the antagonistically active bacteria of *Bacillus velezensis* ONU 553, *Bacillus pumilus* ONU 554, *Bacillus subtilis* ONU 559, *Bacillus megaterium* 11, *Bacillus pumilus* 95 strains. The fatty acid composition was determined by using a gas chromatograph with flame ionization detector Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA), monosaccharides – by gas-liquid chromatography-mass spectrometry on Agilent 6890N/5973 inert (Agilent Technologies, USA), amino acids – on liquid chromatograph Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA). **Results.** There were found the characteristic fatty acids for the studied strains: for strain *B. velezensis* ONU 553 – 17:0, 14:0 anteiso, 11:0 2OH, for *B. subtilis* ONU 559 – 19:0 iso, 19:0 anteiso, for *B. megaterium* 11 – 15:0 2OH and, *B. pumilus* 95 – 15:1 iso w5c and 12:0. The amino acid patterns of the studied strains do not show any significant correlation with the ocean biota pattern and strains *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 and *B. pumilus* 95 show such characteristic for sandy soil biota. In addition to *B. subtilis* group bacteria-specific monosaccharides there were revealed arabinose, polyatomic alcohols – L-iditol and myoinositol, which functions are unknown in bacilli cells. **Conclusions.** It can be concluded that HAI and a15/i15 indices of *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 and *B. subtilis* ONU 559 strains are characteristic of mesophilic bacteria and *B. megaterium* 11 and *B. pumilus* 95 are of moderate thermophiles. The results of the studies support the hypothesis that these bacteria are not autochthonous for the deep-sea bottom sediments of the Black Sea.

Key words: *Bacillus*, the Black Sea, bottom sediments, fatty acids, amino acids, monosaccharides.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Іваниця В.О., Штеніков М.Д., Остапчук А.М. Факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії глибоководних відкладень чорного моря. // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – V. 40, N 4. – P. 94–103.
2. Abdi H. Kendall rank correlation. In: Salkind NJ, editor. Encyclopedia of Measurement and Statistics. – Thousand Oaks (CA): Sage; 2007. P. 508–510.
3. Diomandé SE, Nguyen-The C, Guinebretière MH, Broussolle V, Brillard J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. // Front. Microbiol. – 2015. – 6. – P. 1–20.
4. Doyle R.J. (edit.) Glycomicrobiology. – Kluwer Academic Publishers New



York, Boston, Dordrecht, London, Moscow. 2002. 557 p.

5. Fox A., Stewart G.C., Waller L.N., Fox K.F., Harley W.M., Price R.L. Carbohydrates and glycoproteins of *Bacillus anthracis* and related bacilli: targets for biodetection. // Journal of Microbiological Methods. –2003. – V. 54, N 2. – P. 143–152.

6. Jámbor A., Molnár-Perl I. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. // Journal of Chromatography A. – 2009. – V. 1216, N 34 – P. 6218–6223.

7. Guerrant G.O., Moss C.W. Determination of monosaccharides as aldono-nitrile, O-methyloxime, alditol, and cyclitol acetate derivatives by gas-chromatography. // Analytical Chemistry. – 1984. – V. 56, N 4. – P. 633–638.

8. Kaspar F., Neubauer P., Gimpel M. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. // J Nat Prod. – 2019. – V. 82, N 7. – P. 2038–2053.

9. Logan N. A., De Vos P. *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria NJ: Wiley, 2015.

10. Mandic-Mulec I, Stefanic P, van Elsas J.D. Ecology of *Bacillaceae*. // Microbiology Spectrum. – 2015. – V. 3, N 1. – P. 1–24.

11. Moura A., Savageau M.A., Alves R. Relative Amino Acid Composition Signatures of Organisms and Environments. // PLoS One. – 2013. – V. 8, N 10. – P. 1–9.

12. Nicholson W. L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2002. – V. 59, N 3. – P. 410–416.

13. Raina V., Nayak T., Ray L., Kumari K., Suar M.A Chapter 9. Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. // Microbial Diversity in the Genomic Era. – Academic Press, 2019. – P. 137–152.

14. Rainey F., Oren A. Methods in Microbiology. Volume 38. – Taxonomy of Prokaryotes. – Elsevier Ltd, 2011. – 474 p.

15. Shtenikov M.D., Ostapchuk A. M., Ivanytsia V.O. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black Sea sediments. // Microbiology & Biotechnology. – 2018. – V. 43, N 3. – P. 82–89.

16. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. // Mol Microbiol. – 2005. – V. 56, N 4. – P. 845–857.

17. Virtanen P., Gommers R., Oliphant T.E., Haberland M., Reddy T., Cournapeau D. et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. // Nature methods. – 2020. – V. 17. – P. 261–272.

18. Wunschel D., Fox K.F., Black G.E., Fox A. Discrimination among the *Bacillus cereus* group, in comparison to *B. subtilis*, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNA spacer region PCR. // Syst. Appl. Microbiol. – 1995. – V. 17, N 4. – P. 625–635.

References

1. Ivanytsia VO, Shtenikov MD, Ostapchuk A. M. [Facultatively anaerobic sporeforming bacteria of deep sea sediments of the Black sea]. Microbiology & Biotechnology. 2017; 40(4): 94-103. [In Ukrainian].



2. Abdi H. Kendall rank correlation. In: Salkind NJ, editor. Encyclopedia of Measurement and Statistics. Thousand Oaks (CA): Sage. 2007:508-510.
3. Diomandé SE, Nguyen-The C, Guinebretière MH, Broussolle V, Brillard J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 1-20.
4. Doyle RJ. (edit.) Glycomicrobiology. Kluwer Academic Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow. 2002: 557 p.
5. Fox A, Stewart GC, Waller LN, Fox KF, Harley WM, Price RL. Carbohydrates and glycoproteins of *Bacillus anthracis* and related bacilli: targets for biodection. *Journal of Microbiological Methods.* 2003; 54(2): 143-152.
6. Jámboř A, Molnár-Perl I. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. *Journal of Chromatography A.* 2009; 1216(34): 6218-6223.
7. Guerrant GO, Moss CW. Determination of monosaccharides as aldonoitrile, O-methylxime, alditol, and cyclitol acetate derivatives by gas-chromatography. *Analytical Chemistry.* 1984; 56(4): 633-638.
8. Kaspar F, Neubauer P, Gimpel M. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *J Nat Prod.* 2019; 82(7): 2038-2053.
9. Logan NA, De Vos P. *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. NJ: Wiley, 2015: 1-164.
10. Mandić-Mulec I, Stefanic P, van Elsas JD. Ecology of Bacillaceae. *Microbiology Spectrum.* 2015; 3(1): 1-24.
11. Moura A, Savageau MA, Alves R. Relative Amino Acid Composition Signatures of Organisms and Environments. *PLoS One.* 2013; 8(10): 1-9.
12. Nicholson WL. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2002; 59(3): 410-416.
13. Raina V, Nayak T, Ray L, Kumari K, Suar M. Chapter 9. A Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. *Microbial Diversity in the Genomic Era.* Academic Press, 2019: 137-152
14. Rainey F, Oren A. *Methods in Microbiology.* Volume 38. Taxonomy of Prokaryotes. Elsevier Ltd, 2011: 474.
15. Shtenikov MD, Ostapchuk AM, Ivanytsia VO. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black Sea sediments *Microbiology & Biotechnology.* 2018; 43(3): 82-89.
16. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 2005; 56(4): 845-857.
17. Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D. et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature methods.* 2020; 17: 261-272.
18. Wunschel D, Fox KF, Black GE, Fox A. Discrimination among the *Bacillus cereus* group, in comparison to *B. subtilis*, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNA spacer region PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 1995; 17(4): 625-635.

Стаття надійшла до редакції 23.03.2020 р.

