

Н. Ю. Васильєва, М. О. Кішинська, М. Д. ШтеніковОдеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Всеволода Змієнка, 2, м. Одеса, 65082, Україна
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua**АНАЛІЗ КЛАСТЕРІВ БІОСИНТЕТИЧНИХ ГЕНІВ
BACILLUS PUMILUS ONU 554 *IN SILICO***

Метою роботи був поглиблений аналіз кластерів генів асоційованих з біосинтезом вторинних метаболітів (BGC) *Bacillus pumilus* ONU 554 з використанням біоінформатичних методів. **Методи.** Ідентифікацію виду проводили з використанням серверів TYGS, Comprehensive Genome Analysis (CGA) Service та KmerFinder-3.2; для розрахунку ANI використовували KBase. Гени антибіотикорезистентності шукали через сервер CARD. Аналіз наявності кластерів генів, бактеріоцинів за допомогою antiSMASH, Bagel4 та PRISM відповідно. **Результати.** Показано, що за результатами ідентифікації, філогенетичного аналізу та ДНК-ДНК-гібридизації (DDH), проведеної *in silico*, штаму *Bacillus pumilus* ONU 554 відноситься до групи *B. pumilus*. В геномі штаму виявлені послідовності, що ідентифіковані як профаги, CpG-острівці та CRISPR регіони. Ідентифіковано 15 кластерів біосинтетичних генів (BGC) з використанням інструментів antiSMASH, Bagel4 та PRISM. Показана наявність трьох кластерів генів бактеріоцинів в геномі *Bacillus pumilus* ONU 554, нерибосомних пептидсинтез та комбінованих кластерів, що складаються з нерибосомних пептидсинтез та полікетидсинтез I типу. **Висновки.** Підтверджена належність штаму *Bacillus pumilus* ONU 554 до групи *B. pumilus*. З використанням оновлених алгоритмів аналізу генома визначено більшу кількість кластерів біосинтетичних генів (BGC). Серед кластерів ідентифікованих з високим ступенем подібності були ліхенізин (BGC0000381), бацілізин (BGC0001184), бацілібактин (BGC0002695). Кластера фенгіцину (BGC0001095) та шизокіне-ни (BGC0002683) мали ступінь подібності в діапазоні від 53,0 до 60,0%. Виявлено CpG-острівці, CRISPR регіони, інші гени стійкості до антибіотиків. Отримані результати свідчать, що штаму *Bacillus pumilus* ONU 554 може бути перспективним для пошуку нових сполук з антимікробною та антифунгіцидною активністю.

Ключові слова: *Bacillus pumilus*, кластери генів, біоінформатичний аналіз.

Штами *Bacillus pumilus* стійкими до несприятливих умов, УФ радіації і хімічних речовин. Крім того, штами *B. pumilus* синтезують різноманітні ферменти які знаходять застосування в сільському господарстві, виробництві харчових продуктів, біоремедіації систем стічних вод, біодеградації забруднень навколишнього середовища та фармацевтиці як біоактивні сполуки [5, 17, 33]. Штаму *Bacillus pumilus* ONU 554, ізольований з Чорного моря проявив потуж-



ну антагоністичну активність [27] і був проаналізований біоінформатичними методами [1]. Метою роботи був поглиблений аналіз кластерів генів асоційованих з біосинтезом вторинних метаболітів (BGC) *Bacillus pumilus* ONU 554 з використанням біоінформатичних методів.

Матеріали та методи

Штам *Bacillus pumilus* ONU 554 був виділений з донних відкладень Чорного моря і депонований у Колекції морських і практично корисних мікроорганізмів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, а відповідна секвенована геномна послідовність була внесена до бази даних GenBank під інвентарним номером CP060799.1.

Анотація генома

Анотацію геному проводили за допомогою серверу PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center) мережевого ресурсу BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center – <https://www.bv-brc.org/>) [32].

Філогенетичний аналіз

Для визначення систематичного положення штаму було використано сервіс TYGS (Type (Strain) Genome Server – <https://tygs.dsmz.de/>) [23, 24]. Оцінка коректності топології дерева базувалася на середніх значеннях підтримки гілок та статистиці δ [16]. Середню ідентичність нуклеотидів (ANI) розраховували за допомогою калькулятора ANI на платформі KBase (<https://www.kbase.us/>). Для уточнення результатів використали Comprehensive Genome Analysis (CGA) Service на сервері BV-BRC, що ідентифікує найближчих родичів за вибраним геномом. Він вибирає найближчі еталонні та репрезентативні геноми за допомогою Mash/MinHash [25], а потім бере п'ять із глобальних родин білків BV-BRC [10], що є спільними для всіх вибраних геномів, щоб побудувати дерево на основі амінокислотного та нуклеотидного вирівнювання цих білків, які вирівнюються за допомогою MUSCLE [11], а RaxML [29] використовується для побудови дерева.

Ще одну перевірку на сервері Center for Genomic Epidemiology (<https://www.genomicepidemiology.org/>) проводили з використанням веб-сервера KmerFinder-3.2 (<https://cge.food.dtu.dk/services/KmerFinder/>) [14].

Виявлення плазмід, інсерційних елементів, мобільних елементів, генів антибіотикорезистентності та CRISPR–Cas

Мапу геному відображали за допомогою сервера CGView Server (<https://proksee.ca/>) [12]. Пошук плазмід, інсерційних елементів, а також CRISPR–Cas проводилися за допомогою PlasmidFinder – <https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder> [8], ISEScan та CRISPRCasFinder – <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder> відповідно [18].

Веб-сервер PathogenFinderv.1.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/PathogenFinder/>) використовувався для оцінки патогенності *Bacillus pumilus* ONU 554 [9].

Пошук мобільних генетичних елементів, включаючи CpG-острівці та фагові ділянки в геномі *Bacillus pumilus* ONU 554, проводили за допомогою інструментів IslandViewer 4 (<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>)



browse/) та PHASTEST (PHAge Search Tool with Enhanced Sequence Translation – <https://phastest.ca/>) [4].

Сервіс CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database – <https://card.mcmaster.ca/>) використали для пошуку генів антибіотикорезистентності за допомогою трьох різних алгоритмів, а саме ‘perfect’, ‘strict’ та ‘loose’ [3].

Ідентифікація кластерів генів асоційованих з біосинтезом вторинних метаболітів

Біоінформаційні інструменти antiSMASH («antibiotics and secondary metabolite analysis shell» (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>) version 7.0.0 (алгоритм relaxed) [6] і BAGEL4 (<http://bagel.molgenrug.nl/>) [2, 31] та PRediction Informatics for Secondary Metabolites (<http://magarveylab.ca/prism/>) [27], використовували для пошуку генних кластерів (BGC), які беруть участь у синтезі полікетидів і бактеріоцинів.

Результати та їх обговорення

Загальна анотація геному *Bacillus pumilus* ONU 554

Геном *Bacillus pumilus* ONU 554 складається з однієї кільцевої хромосоми (3642544 п.н. – ідентифікатор CP060799.1), та однієї плазмиди pONU554 (95374 пар нуклеотидів – ідентифікатор CP060800.1). Вміст GC – пар у досліджуваного мікроорганізму складає 41,8%. Визначено наявність 3749 білок-кодуючих послідовностей ДНК (CDS), які були розподілені вздовж обох ланцюгів. Ідентифіковано 81 ген тРНК та 24 гени рРНК (8 генів 5S рРНК, 8 генів 23S рРНК та 8 генів 16S рРНК), а також знайдено 47 регіонів, що повторюються, одну ділянку CRISPR, одну фагову ділянку та 16 CpG-острівців (табл. 1, табл. 2, рис. 1).

За результатами аналізу на патогенність на сервері Center for Genomic Epidemiology (алгоритм PathogenFinder) штам *Bacillus pumilus* ONU 554 виявився не патогенним.

Зі знайдених CpG-острівців, вісім є ідентифікованими за допомогою хоча б одного методу. Чотири CpG-острівці були виявлені з використанням методу SIGI-HMM, а інші чотири – із застосуванням методу IslandPath-DIMOB (табл. 2).

Таким чином кожен з CpG-острівців був підтверджений двічі за різними алгоритмами пошуку. Присутність геномних острівців (GI) допомагає мікроорганізмам в адаптації, еволюції та перенесенні генів, що пов’язані з метаболізмом, стійкістю до антибіотиків [19].

Візуалізацію генома робили за допомогою сервера Proksee (рис. 2).

Таксономічне положення *Bacillus pumilus* ONU 554

Для уточнення систематичного положення *Bacillus pumilus* ONU 554 було використано комплекс узгоджених між собою методів. Згідно із результатами філогенетичного аналізу на сервісі TYGS *Bacillus pumilus* ONU 554 є близьким родичем штаму *Bacillus pumilus* NCTC 10337 (NZ_LT906438.1), ізольованого з донних відкладень мангрових зарослей у Саудівської Аравії [26] та референтного штаму *Bacillus pumilus* ATCC 7061 (рис. 3).

Отриманий висновок, базувався на підставі попарних порівнянь між набором геномів з використанням GBDP і точних міжгеномних відстаней, виве-



Таблиця 1

Загальні характеристики геному *Bacillus pumilus* ONU 554

Table 1

General characteristics of the *Bacillus pumilus* ONU 554 genome

Показники	Властивості	Статистика
Статистика геному	Контиги	1
	Довжина геному	3642544
	Вміст GC	41,78
	Контиг L50	1
Геномні характеристики	CDS	3749
	tRNA	81
	Регіони, що повторюються	47
	rRNA	24
Характеристики білків	Гіпотетичні білки	733
	Білки з функціональними призначеннями	3016
	Білки з призначенням EC-номерів	922
	Білки з призначенням GO	767
	Білки з призначенням шляхів	680
	Білки з призначенням підсистем	1074
	Білки з призначенням родоспецифічної родини PATRIC (PLfam)	3629
	Білки з призначенням міжродової родини PATRIC (PGfam)	3617
Спеціальні гени	Фактор вірулентності (PATRIC_VF)	2
	Фактор вірулентності (Victors)	2
	Транспортер(TCDB)	68
	Лікарська мішень (DrugBank)	21
	Лікарська мішень (TTD)	1
	Резистентність до антибіотиків (PATRIC)	41
	Резистентність до антибіотиків (CARD)	2
	Резистентність до антибіотиків (NDARO)	2

дених за формулою відстані d5 [22]. Для кожного було розраховано 100 реплік відстані. Цифрові значення DDH та довірчі інтервали розраховували з використанням рекомендованих налаштувань GGDC 4.0 [22, 23]. Усі результати порівнянь, отримані за формулою 5 dDDH, були вищими за видовий поріг (> 70%) [5].



Таблиця 2

Характеристика CpG-острівців у геномі *Bacillus pumilus* ONU 554

Table 2

Characteristics of CpG islands in the genome of *Bacillus pumilus* ONU 554

№ CpG-острівця	Початок послідовності	Кінець послідовності	Довжина послідовності (п.н.)	Метод прогнозування
Island 1	591687	596050	4363	Predicted by at least one method
Island 2	1711843	1718753	6910	Predicted by at least one method
Island 3	2254521	2258700	4179	Predicted by at least one method
Island 4	2631604	2635747	4143	Predicted by at least one method
Island 5	2671766	2681125	9359	Predicted by at least one method
Island 6	2691723	2707,393	15670	Predicted by at least one method
Island 7	2714020	2736640	22620	Predicted by at least one method
Island 8	3553224	3568250	10026	Predicted by at least one method
Island 1	591687	596050	4363	SIGI– HMM
Island 2	1711843	1718753	6910	SIGI– HMM
Island 3	2254521	2258700	4179	SIGI– HMM
Island 8	3553224	3568250	10026	SIGI– HMM
Island 4	2631604	2635747	4143	IslandPath– DIMOB
Island 5	2671766	2681125	9359	IslandPath– DIMOB
Island 6	2691723	2707393	15670	IslandPath– DIMOB
Island 7	2714020	2736640	22620	IslandPath– DIMOB

За результатами ідентифікації штаму за допомогою ресурсу BV-BRC (Comprehensive Genome Analysis (CGA) Service) показано, що штам *Bacillus pumilus* ONU 554 є максимально подібним до штаму *Bacillus pumilus* SAFR-032 (NC_009848.4), який було виділено на заводі зі складання космічних кораблів у Лабораторії реактивного руху НАСА (рис. 4).

Порівняльний аналіз геному через веб-сервер KmerFinder-3.2 (Center for Genomic Epidemiology) показав високу ідентичність *Bacillus pumilus* ONU 554 до штамів *Bacillus pumilus* EB138 (NZ_CP081199.1), ізолюваного з коріандру посівного, *Bacillus pumilus* BIM B-171 (NZ_CP085037.1), ізолюваного з дерново-підзолистих ґрунтів та *Bacillus pumilus* 3-19 (NZ_CP054310.1), ізолюваного з ґрунту.





Рис. 1. Результат пошуку CpG-острівців у геномі *Bacillus pumilus* ONU 554 з використанням серверу IslandViewer 4

Fig. 1. The result of searching for CpG- islands in the genome of *Bacillus pumilus* ONU 554 using the IslandViewer 4 serve



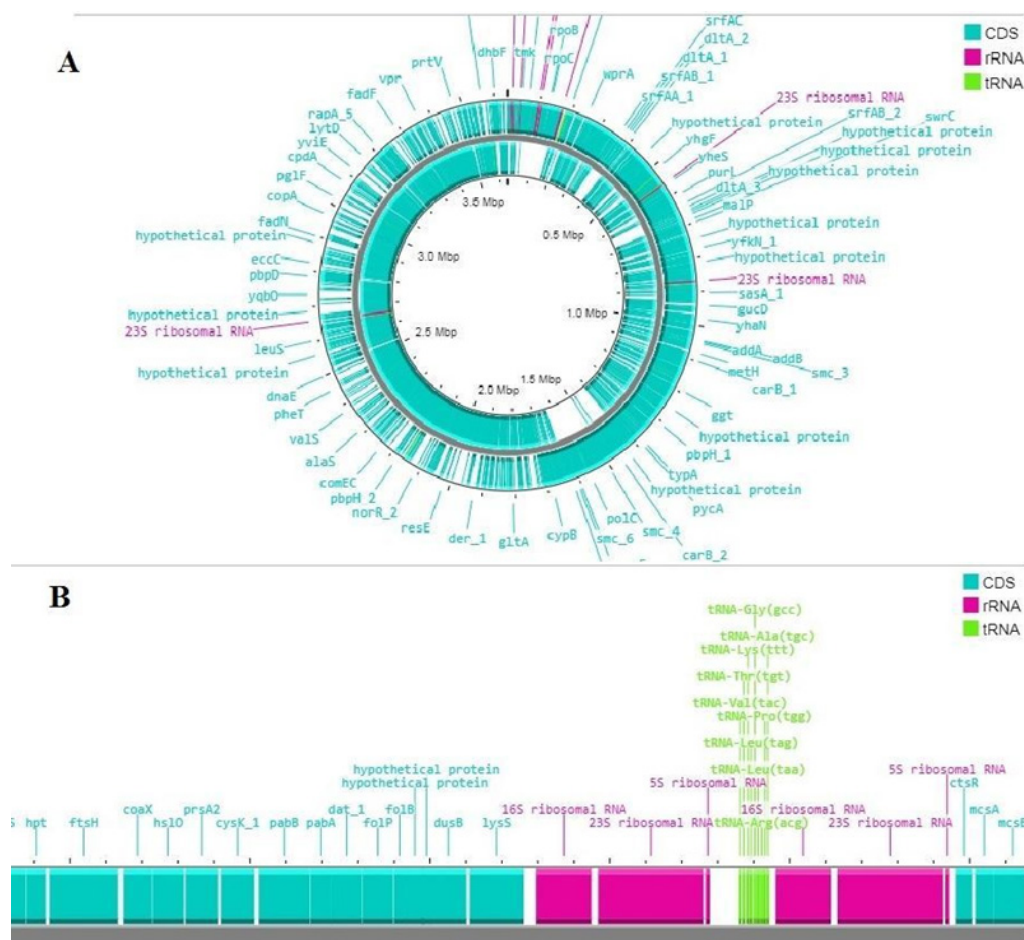


Рис. 2. Мапа, що ілюструє хромосому генома *Bacillus pumilus* ONU 554
(отримана за допомогою Proksee, А – кільцева хромосома,
В – збільшена ділянка хромосоми)

Fig. 2. A map illustrating the chromosome of the genome of *Bacillus pumilus* ONU 554
(obtained using Proksee, A is a circular chromosome,
B is an magnified enlarged section of the chromosome)

Для проведення розрахунку середньої нуклеотидної ідентичності між геномами використали інструмент FastANI на сервері KBase. Визначено, що максимальний показник ANI зафіксовано між штамом *Bacillus pumilus* ONU 554 і штамами *Bacillus pumilus* 3-19 (99,54%) та *Bacillus pumilus* EB138 (98,35%), що за рекомендованими пороговими значеннями OrthoANI [20] свідчать, про високу спорідненість між штамми.

Подальший аналіз показав присутність в геномі *Bacillus pumilus* ONU 554 однієї послідовності CRISPR, що локалізується в регіоні від 1149014 до 1149147 нуклеотида в геномі. У цій послідовності наявні 2 спейсерних регіони (рис. 5).



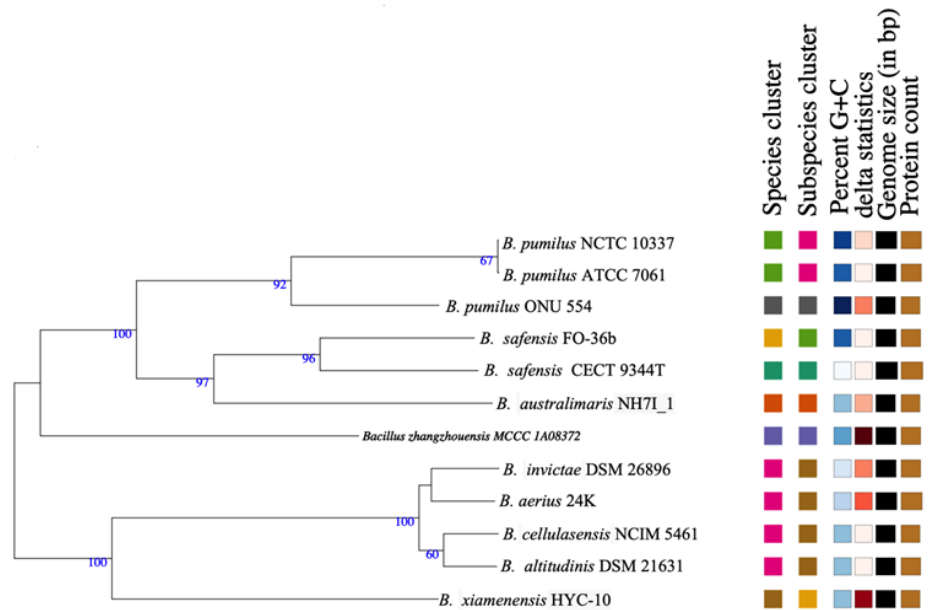


Рис. 3. Дендрограма філогенетичних зв'язків *Bacillus pumilus* ONU 554, побудована на основі ДНК–ДНК гібридизації повного геному

Fig. 3. Dendrogram of phylogenetic relationships of the *Bacillus pumilus* strain ONU 554, constructed on the basis of DNA–DNA hybridization of the whole genome

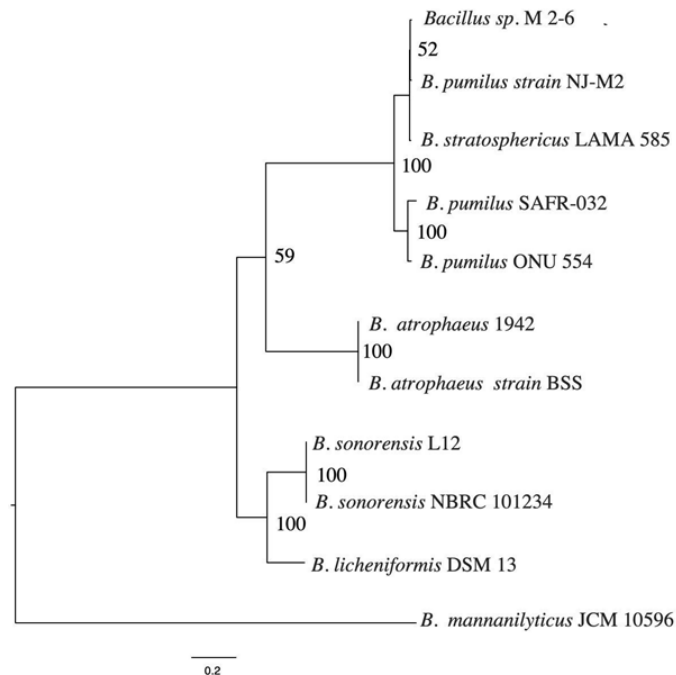


Рис. 4. Дендрограма філогенетичних зв'язків *Bacillus pumilus* ONU 554, побудована на основі Comprehensive Genome Analysis ресурсу BV-BRC

Fig. 4. Dendrogram of phylogenetic relationships of the *Bacillus pumilus* strain ONU 554, constructed based on the Comprehensive Genome Analysis of the BV-BRC resource

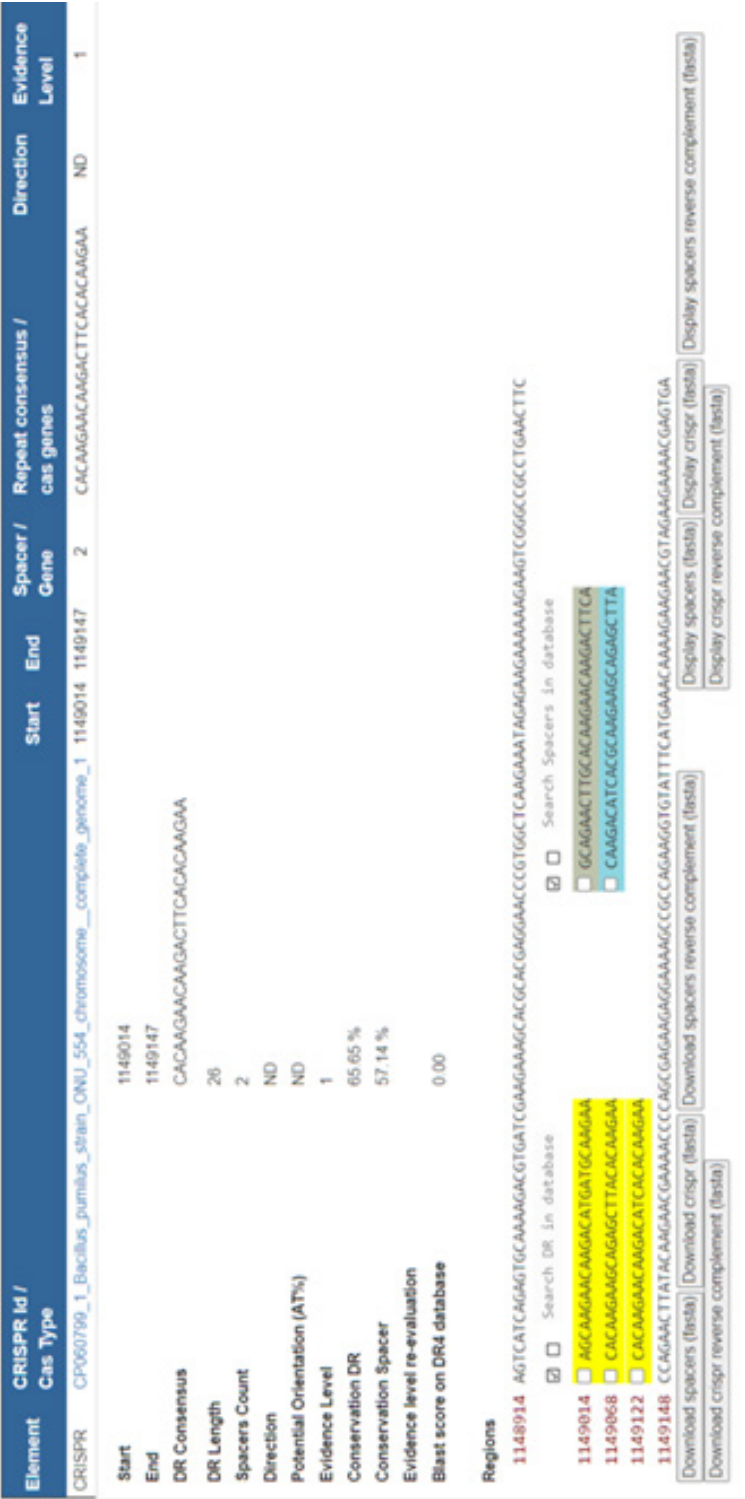


Рис. 5. CRISPR–Cas періони *Bacillus pumilus* ONU 554

Fig. 5. CRISPR–Cas regions of *Bacillus pumilus* ONU 554

Локуси генів антибіотикорезистентності

Серед знайдених були гени кластеру генів стійкості до глікопептидів *vanG*, а саме гени *vanT* та *vanY* [7]; ген *FosBx1*, що є геном стійкості до фосфоміцину [30]; гени *qacG* та *qacJ*, що відносяться до системи ефлюксного насосу із мультирезистентністю [15]. Ген *qacG* відповідає за стійкість до бензалконію хлориду та етидію броміду, а ген *qacJ* за стійкість до сполук четвертинного амонію. Ген *cat86* відноситься до хлорамфеніколацетилтрансфераз [13] (рис. 6).

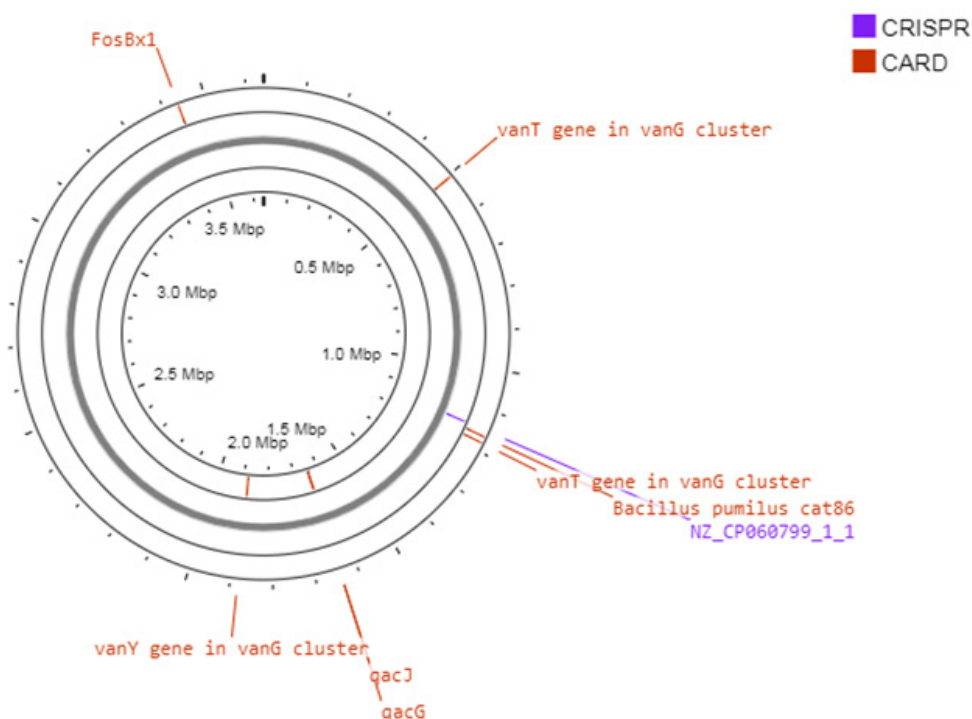


Рис. 6. Розташування генів антибіотикорезистентності та CRISPR–Cas регіону, що були ідентифіковані в геномі *Bacillus pumilus* ONU 554 (мапа отримана за допомогою Proksee)

Fig. 6. Location of antibiotic resistance genes and CRISPR–Cas region identified in the genome of *Bacillus pumilus* ONU 554 (map obtained using Proksee)

Фагові вставки

Геном *Bacillus pumilus* ONU 554 містить одну фагову вставку, що складається з 3737 генів (з них 74 фагових gena) (рис. 7). Регіон з фаговою вставкою локалізовано з 2662087 по 2748716 нуклеотид в геномі. Переважаючими в тому регіоні є послідовності фагів *Bacillus phage* vB_BtS_B83 (NC_048762) та *Bacillus phage* vB_BtS_BMBtp14 (NC_048640.1). Менш представлені послідовності *Brevibacillus phage* Osiris (NC_028969.1) та *Aeribacillus phage* AP45 (NC_048651.1).



Fig. 7. The region of the phage insertion in the genome of *Bacillus pumilus* ONU 554 found PHATEST

Кластери генів вторинних метаболітів в геномі *Bacillus pumilus* ONU 554

Кластери генів асоційованих з біосинтезом вторинних метаболітів у геномі *Bacillus pumilus* ONU 554 були визначені з використанням інструментів антиSMASH [21], PRISM [28] та серверу Bagel4 [2].

Загалом, з використанням різних біоінформатичних програм, було виявлено 15 різноманітних регіонів, що кодують біосинтетичні кластери генів. Серед них три регіони відповідають за синтез бактеріоцинів – Pumilarin, UviB та Closticin_574 (табл. 3).

Таблиця 3
Послідовності бактеріоцинів, знайдені у геномі *Bacillus pumilus* ONU 554

Bacterocin sequences found in the genome of *Bacillus pumilus* ONU 554

Послідовність бактеріоцинів	Початок	Кінець	Клас	Мікроорганізм, що має подібний бактеріоцин
CP0607991.0.AOI_01	2252591	2272912	Pumilarin (W8QY45)	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)
CP0607991.0.AOI_02	2713932	2734121	UviB (P15936)	<i>Clostridium perfringens</i>
CP0607991.0.AOI_03	3293027	3313906	Closticin_574 (Q8GCU9)	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168); <i>Bacillus pumilus</i> (strain SAFR-032)

Більшість знайдених кластерів відносяться до нерибосомних пептидсинтез або до комбінованого кластеру нерибосомна пептидсинтеза/полікетидсинтеза I типу. Серед ідентифікованих продуктів можна виділити бацилізин, бацилібактин, субтилін, фенгіцин, ліхенізин та цвіттерміцин А. Причому високий показник подібності було отримано при ідентифікації кластерів ліхенізин (BGC0000381), бацилізин (BGC0001184) та бацилібактин (BGC0002695). Інші ідентифіковані кластери мають показник подібності з кластерами генів асоційованих з біосинтезом вторинних метаболітів на рівні від 60% та менше. Узагальнені результати аналізу організації визначених кластерів генів асоційованих з біосинтезом наведено на рисунку 8 та таблиці 4.

Результати пошуку кластерів біосинтетичних генів в геномі штаму *Bacillus pumilus* ONU 554 з використанням серверу PRISM співпали з попередніми [1] частково (табл. 5). По-перше сервер PRISM ідентифікував лише 7 кластерів біосинтетичних генів, по-друге принциповою відмінністю є ідентифікація кластеру ComX.

ComX – це пептид, що бере участь в регуляції компетентності бактерій і продукції поверхнево-активної речовини в *Bacillus subtilis*. Також відомо, що пептид, що кодується цим кластером бере участь в регуляції системи кворум сенсинг.



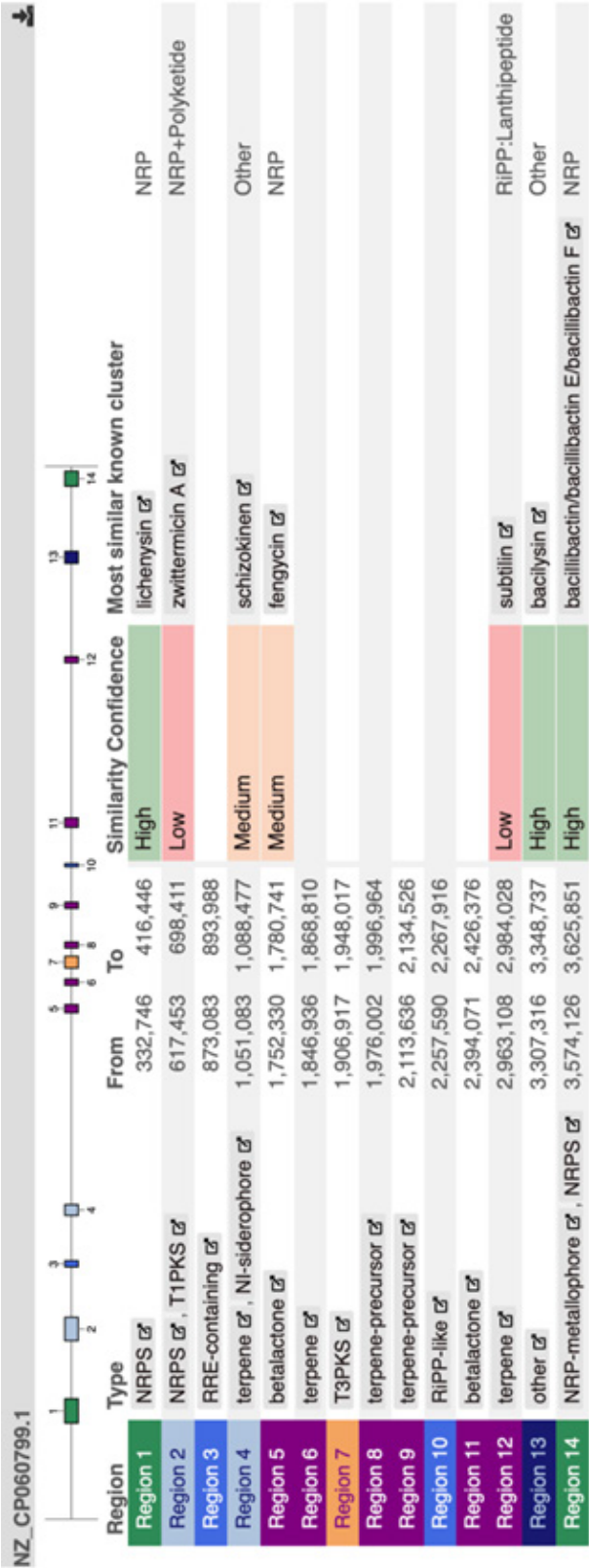


Рис. 8. Кластери генів *Bacillus pumilus* ONU 554, знайдені за допомогою сервера antiSMASH

Fig. 8. Gene clusters of *Bacillus pumilus* ONU 554 found using the antiSMASH server

Таблиця 4

Кластери генів, ідентифіковані в геномі *Bacillus pumilus* ONU 554, за допомогою сервера antiSMASH

Table 4

Gene clusters identified in the genome of *Bacillus pumilus* ONU 554 using the antiSMASH server

Region	Тип кластеру	Розмір кластеру (п.н.)	Найбільш відомий подібний кластер	Тип продукту, що синтезується	Ступінь подібності (%)	Кластер зустрічається у:
1	NRPS	83,701	Ліхенізин (BGC0000381)	Нерибосомна пептидсингетаз	85	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 = ATCC 14580
2	NRPS, T1PKS	80,959	Цвіттерміцин А (BGC0001059)	Нерибосомна пептидсингетаз, полікетидсингетаз I типу	18	<i>Bacillus cereus</i>
3	RRE- element containing cluster	20,906	не визначено	не визначено	–	–
4	terpene, NI- siderophore	37,395	Шизокінен (BGC0002683)	Ферменти біосинтезу терпеноїдів та сидерофорів	60	<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120
5	betalactone	28,412	Фенгіцин (BGC0001095)	Нерибосомна пептидсингетаз	53	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42
6	terpene	21,875	не визначено	не визначено	–	–
7	T3PKS	41,101	не визначено	не визначено	–	–
8	terpene-precursor	20,963	не визначено	не визначено	–	–
9	terpene-precursor	20,891	не визначено	не визначено	–	–
10	RiPP- like	10,327	не визначено	не визначено	–	–
11	betalactone	32,306	не визначено	не визначено	–	–
12	terpene	20,921	Субілін (BGC0000559)	RiPP: лантипептид	23	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> ATCC 6633
13	інші	41,422	Бацілізин (BGC0001184)	інші	85	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42
14	NRP- metallophore, NRPS	51,726	Бацілібактин (BGC0002695)	Нерибосомна пептидсингетаз	80	<i>Bacillus sp.</i> WMMC1349



Таблиця 5

Кластери генів, ідентифіковані в геномі *Bacillus pumilus* ONU 554,
за допомогою програми PRISM

Table 5

Gene clusters identified in the genome of *Bacillus pumilus* ONU 554 using
the PRISM program

Регіон	Тип кластеру	Тип продукту, що синтезується	Найбільш відомий подібний кластер
1	NRPS	Нерибосомна пептидсинтетаза	Ліхенізин (BGC0000381)
2	NRPS, T1PKS	Полікетид, нерибосомальний пептид	Цвіттерміцин А (BGC0001059)
3	NI– siderophore	Ферменти біосинтезу терпеноїдів та сидерофорів	Шизокінен (BGC0002683)
4	Bacteriocin	Бактеріоцин	Субтилін (BGC0000559)
5	ComX	не визначено	не визначено
6	інші	інші	Бацілізин (BGC0001184)
7	NRPS	Нерибосомна пептидсинтетаза	Бацілібактин (BGC0002695)

Слід відмітити, що при аналізі геному програмою antiSMASH, був ідентифікований регіон (2257590 – 2267916), що кодує бактеріоцин (рис. 9). При аналізі результатів за базою MiBIG ця послідовність є подібною до кластера, що кодує ентероцин AS–48, але цей кластер не був ідентифікований (табл. 4) у зв'язку з низьким показником ідентичності. За результатами аналізу через сервер Bagel4 знайдено кластер, що кодує пуміларин (2,252,591 – 2,272,912), та є аналогом ентероцину AS–48.

Тому, скоріш за все, цей кластер можна ідентифікувати як кластер бактеріоцину, що кодує пуміларин. Два інші кластери генів, ідентифіковані сервером Bagel4 (табл. 3) іншими програмами не були повторно ідентифіковані.

Таким чином, аналіз геному *Bacillus pumilus* ONU 554 показав деякі відмінності порівняно з попередніми результатами [1], а саме: визначено 8 CpG-острівців, наявність детермінант резистентності не тільки до хлорамфеніколацетилтрансферазам (*cat-86*), але й до глікопептидів, фосфоміцину, бензалконію хлориду та етидію броміду та сполук четвертинного амонію; наявність однієї послідовності CRISPR, підтверджено наявність одної ділянки з фаговою вставкою, збільшено кількість ідентифікованих кластерів генів асоційованих з біосинтезом вторинних метаболітів.



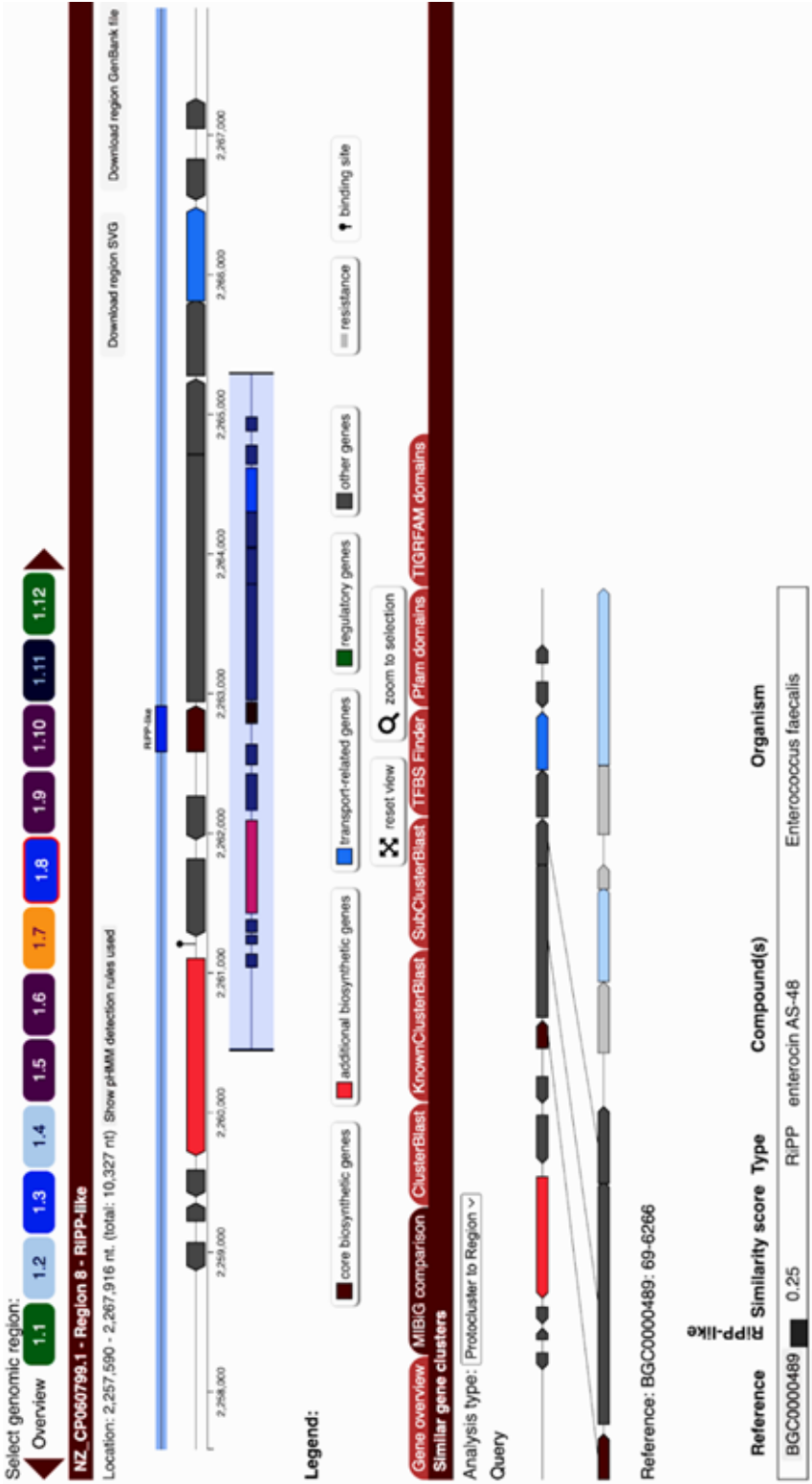


Рис. 9. Кластер генів, ідентифікованих за допомогою програми antiSMASH, який ймовірно кодує біосинтез бактеріоцину пуміліну

Fig. 9. Gene cluster identified using the antiSMASH program, which likely encodes the biosynthesis of the bacteriocin pumilin



Проведений аналіз покращує розуміння властивостей штаму, що проявляється через фенотипові ознаки та полегшує молекулярно-генетичний аналіз штаму *Bacillus pumilus* ONU 554, який може бути потенційним продуцентом нових сполук з вираженою біологічною активністю.

N. Yu. Vasylieva, M. O. Kishynska, M. D. Shtenikov

Odesa I. I. Mechnikov National University,
2 Vsevoloda Zmiienka St, Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

ANALYSIS OF BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS OF *BACILLUS PUMILUS* ONU 554 *IN SILICO*

Summary

The aim of the work was an in-depth analysis of gene clusters associated with the biosynthesis of secondary metabolites (BGC) of *Bacillus pumilus* ONU 554 based on bioinformatics approach. **Methods.** Identification of species was performed with tools of TYGS server; Comprehensive Genome Analysis (CGA) Service and KmerFinder-3.2 servers; KBase was used to calculate ANI. Antibiotic resistance genes were searched through the CARD server. Analysis of the presence of gene clusters associated with the biosynthesis of secondary metabolites, bacteriocin, using antiSMASH, PRISM and Bagel4 respectively. **The results.** It was shown that according to the results of identification, phylogenetic analysis and DNA-DNA hybridization (DDH) performed in silico the *Bacillus pumilus* ONU 554 strain belongs to the *B. pumilus* group. Sequences identified as possible phages, CpG islands and CRISPR regions were found in the genome of our strain. 15 biosynthetic gene clusters (BGC) were identified using antiSMASH, PRISM and Bagel4 servers. The presence of three bacteriocin gene clusters in the genome of *Bacillus pumilus* ONU 554, nonribosomal peptide synthetases and combined clusters of nonribosomal peptide synthetase/polyketide synthetase type I were shown. **Conclusions.** The affiliation of *Bacillus pumilus* ONU 554 to the *B. pumilus* group was confirmed. Using updated genome analysis algorithms, a larger number of biosynthetic gene clusters (BGC) were identified. Among the clusters identified with a high degree of similarity were lichenisin (BGC0000381), bacillisin (BGC0001184), bacillibactin (BGC0002695). The fengycin (BGC0001095) and schizokinins (BGC0002683) clusters had a degree of similarity ranging from 53.0 to 60.0 %. Updated results on the detection of CpG-islands, CRISPR regions, and antibiotic resistance genes. The obtained results indicate that the *Bacillus pumilus* ONU 554 strain is promising for use in the field of "Blue Biotechnology" for the development of new drugs with antimicrobial and antifungal activity.

Key words: *Bacillus pumilus*, biosynthetic gene clusters (BGC), bioinformatic analysis.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Іваниця В.О., Штеніков М.Д., Остапчук А.М., Васильєва Н.Ю., Калиновський Й. Сіквенс геному *Bacillus pumilus* опу 554, ізольованого з глибоководних донних відкладень Чорного моря //Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – № 3. – С. 46–57.
DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3\(50\).219362](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3(50).219362)
2. Agrawal P., Amir S., Barua D., Mohanty D. RiPPMiner-Genome: A Web Resource for Automated Prediction of Crosslinked Chemical Structures of RiPPs by Genome Mining // J Mol Biol. – 2021. – V. 433(11). – Article: 166887. doi: 10.1016/j.jmb.2021.166887.
3. Alcock B., Huynh W., Chalil R., Smith K.W., Raphenya A.R., Wlodarski M.A., Edalatmand A., Petkau A., Syed S.A., Tsang K.K., Baker S.J.C., Dave M., McCarthy M.C., Mukiri K.M., Nasir J.A., Golbon B., Imtiaz H., Jiang X., Kaur K., Kwong M., Liang Z.C., Niu K.C., Shan P., Yang J.Y.J., Gray K.L., Hoad G.R., Jia B., Bhando T., Carfrae L.A., Farha M.A., French S., Gordzevich R., Rachwalski K., Tu M.M., Bordeleau E., Dooley D., Griffiths E., Zubyk H.L., Brown E.D., Maguire F., Beiko R.G., Hsiao W.W.L., Brinkman F., Domselaar G.V., McArthur A.G. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database // Nucleic Acids Research. – 2023. – V. 51. – D690–D699. DOI: 10.1093/nar/gkac920.
4. Arndt D., Grant J.R., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., Wishart D.S. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool// Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44(1). – P. 16–21. DOI: 10.1093/nar/gkw387
5. Bach E., Rangel C.P., Ribeiro I.D.A., Passaglia L.M.P. Pangenome analyses of *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, and *Priestia megaterium* exploring the plant-associated features of bacilli strains isolated from canola. //Mol Genet Genomics. – 2022. – V. 297(4). – P. 1063–1079.
DOI: 10.1007/s00438-022-01907-0.
6. Blin K., Shaw S., Augustijn H.E., Reitz Z.L., Biermann F., Alanjary M., Fetter A., Terlouw B.R., Metcalf W.W., Helfrich E.J.N., van Wezel G.P., Medema M.H., Webber T. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualization // Nucleic Acids Research. – 2023. – V. 51(5). –P. W46–W50. DOI: 10.1093/nar/gkad344
7. Boyd D.A., Du T., Hizon R., Kaplen B., Murphy T., Tyler S., Brown S., Jamieson F., Weiss K., Mulvey MR. VanG-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains isolated in Canada // Antimicrob Agents Chemother. – 2006. – V. 50(6). – P. 2217–2221. doi: 10.1128/AAC.01541-05.
8. Carattoli A., Zankari E., Garcia-Fernandez A., Voldby Larsen M., Lund O., Villa L., Aarestrup F., Hasman H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2014. – V. 58. – P. 3895–3903.
DOI: 10.1128/AAC.02412-13.
9. Cosentino S., Voldby L.M., Møller A.F., Lund O. PathogenFinder-distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data // PLoS One. – 2013. – V. 8(10). – Article: e77302.
doi: 10.1371/journal.pone.0077302..



10. Davis J.J., Gerdes S., Olsen G.J., Olson R., Pusch G.D., Shukla M., Vonstein V., Wattam A.R., Yoo H. PATtyFams: Protein Families for the Microbial Genomes in the PATRIC Database // *Front Microbiol.* – 2016. – V. 7. – Article:118. doi: 10.3389/fmicb.2016.00118.
11. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32(5). – P. 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340.
12. Grant J.R., Enns E., Marinier E., Mandal A., Herman E.K., Chen C., Graham M., Van Domselaar G., Stothard P. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes // *Nucleic Acids Research.* – 2023. – V. 51(W1). – P. W484–W492. DOI: 10.1093/nar/gkad326.
13. Harwood C.R., Williams D.M., Lovett P.S. Nucleotide sequence of a *Bacillus pumilus* gene specifying chloramphenicol acetyltransferase // *Gene.* – 1983. – V. 24(2-3). – P. 163–169. doi: 10.1016/0378-1119(83)90076-8.
14. Hasman H., Saputra D., Sicheritz-Ponten T., Lund O., Svendsen C.A., Frimodt-Møller N., Aarestrup F.M. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples // *J Clin Microbiol.* – 2014. – V. 52(1). – P. 139–146. doi: 10.1128/JCM.02452-13.
15. Heir E., Sundheim G., Holck A.L. The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry // *J Appl Microbiol.* – 1999. – V. 86(3). – P. 378–388. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00672.x.
16. Holland B.R., Huber K.T., Dress A., Moulton V. Delta plots: A tool for analyzing phylogenetic distance data // *Mol. Biol. Evol.* – 2002. – V. 19. – P. 2051–2059. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004030
17. Iqbal S., Vollmers J., Janjua H.A. Genome Mining and Comparative Genome Analysis Revealed Niche-Specific Genome Expansion in Antibacterial *Bacillus pumilus* Strain SF-4 // *Genes (Basel).* – 2021. – V. 12(7). – Article:1060. doi: 10.3390/genes12071060.
18. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems // *Curr Opin Microbiol.* – 2017. – V. 37. – P. 67–78. doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008.
19. Langille M.G., Hsiao W.W., Brinkman F.S. Detecting genomic islands using bioinformatics approaches // *Nat Rev Microbiol.* – 2010. – V. 8(5). – P. 373–382. doi: 10.1038/nrmicro2350.
20. Lee I., Kim Y.O., Park S.C., Chun J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2016. – V. 66. – P. 1100–1103 DOI: 10.1099/ijsem.0.000760
21. Medema M.H., Blin K., Cimermancic P., De Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M.A., Weber T., Takano E., Breitling R. antiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – P. 339–346 DOI: 10.1093/nar/gkr466
22. Meier–Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.–P., Göker M. Genome sequence–based species delimitation with confidence intervals and improved



- distance functions // BMC Bioinformatics. – 2013. – V. 14. – Article:60. DOI: 10.1186/1471-2105-14-60.
23. Meier-Kolthoff J.P., Sardà Carbasse J., Peinado-Olarte R.L., Göker M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes // Nucleic Acid Res. – 2022. – V. 50. – P. D801–D807. DOI: 10.1093/nar/gkab902.
24. Meier-Kolthoff J.P., Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy // Nat Commun. – 2019. – V. 10(1). – P. 1-10. DOI: 10.1038/s41467-019-10210-3
25. Ondov B.D., Treangen T.J., Melsted P., Mallonee A.B., Bergman N.H., Koren S, Phillippy A.M. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash // Genome Biol. – 2016. – 17(1). – Article:132. doi: 10.1186/s13059-016-0997-x
26. Qureshi K.A., Seroor M., Al-Masabi A., Saykhan M.A., Mutairi Y.A., Elhassan G.O., Khan R.A. Bio-characterizations of some marine bacterial strains isolated from mangrove sediment samples of four major cities of Saudi Arabia // J. Environ. Biol. – 2020. – V. 41. – P. 1003–1012 DOI: 10.22438/jeb/41/5/MRN-1317
27. Shtenikov M.D., Ostapchuk A.M., Ivanytsia V.O. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black sea sediments // Мікробіологія і біотехнологія. – 2018. – № 3. – С. 82–89 DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3\(43\).142582](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3(43).142582)
28. Skinnider M.A., Dejong C.A., Rees P.N., Johnston C.W., Li H., Webster A.L.H., Wyatt M.A., Magarvey N.A. Genomes to natural products: PRediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM) // Nucleic Acids Research. – 2015. – V. 43(20). – P. 9645–9662. DOI: 10.1093/nar/gkv1012.
29. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // Bioinformatics. – 2014. – V. 30(9). – P. 1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
30. Thompson M.K., Keithly M.E., Harp J., Cook P.D., Jagessar K.L., Sulikowski G.A., Armstrong R.N. Structural and chemical aspects of resistance to the antibiotic fosfomycin conferred by FosB from *Bacillus cereus* // Biochemistry. – 2013. – V. 52(41). – P. 7350–62. doi: 10.1021/bi4009648.
31. van Heel A. J., Jong A., Song C., Viel J.H., Kok J., Kuipers O.P., BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins // Nucleic Acids Research. – 2018. – V. 46(W1). – P. 278–281. DOI: 10.1093/nar/gky383
32. Wattam A.R., Brettin T., Davis J.J., Gerdes S., Kenyon R., Machi D. Assembly, Annotation, and Comparative Genomics in PATRIC, the All Bacterial Bioinformatics Resource Center // Comparative Genomics. Methods Mol Biol. 2018. – P. 79–101.
33. Ziganshina E.E., Mohammed W.S., Shagimardanova E.I., Shigapova L.H., Ziganshin A.M. Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* strain EZ-C07 isolated from digested agricultural wastes // BMC Res Notes. – 2018. V. 11(1). – Article:606. doi: 10.1186/s13104-018-3710-1



REFERENCES

1. Ivanytsia VO, Shtenikov MD, Ostapchuk AM, Vasylieva NYu, Kalynovsky Y. Sequencing of the genome *Bacillus pumilus* ONU 554 isolated from deep water sediments of Black Sea. *Microbiology and Biotechnology*. 2020;3:46–57. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3\(50\).219362](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3(50).219362)
2. Agrawal P, Amir S, Deepak, Barua D, Mohanty D. RiPPMiner-Genome: A Web Resource for Automated Prediction of Crosslinked Chemical Structures of RiPPs by Genome Mining. *J Mol Biol*. 2021;433(11):166887. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166887>.
3. Alcock B, Huynh W, Chalil R, Smith KW, Raphenya AR, Wlodarski MA, Edalatmand A, Petkau A, Syed SA, Tsang KK, Baker SJC, Dave M, McCarthy MC, Mukiri KM, Nasir JA, Golbon B, Imtiaz H, Jiang X, Kaur K, Kwong M, Liang ZC, Niu KC, Shan P, Yang JYJ, Gray KL, Hoad GR, Jia B, Bhando T, Carfrae LA, Farha MA, French S, Gordzevich R, Rachwalski K, Tu MM, Bordeleau E, Dooley D, Griffiths E, Zubyk HL, Brown ED, Maguire F, Beiko RG, Hsiao WWL, Brinkman F, Domselaar GV, McArthur AG. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*. 2023;51:D690–D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>.
4. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(1):16–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
5. Bach E, Rangel CP, Ribeiro IDA, Passaglia LMP. Pangenome analyses of *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, and *Priestia megaterium* exploring the plant– associated features of bacilli strains isolated from canola. *Mol Genet Genomics*. 2022;297(4):1063–1079. <https://doi.org/10.1007/s00438-022-01907-0>
6. Blin K, Shaw S, Augustijn HE., Reitz ZL, Biermann F, Alanjary M, Fetter A, Terlouw BR, Metcalf WW, Helfrich EJN, van Wezel GP, Medema MH, Webber T. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualization. *Nucleic Acids Research*. 2023;51(1):W46–W50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>
7. Boyd DA, Du T, Hizon R, Kaplen B, Murphy T, Tyler S, Brown S, Jamieson F, Weiss K, Mulvey MR. VanG-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains isolated in Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(6):2217–2221. <https://doi.org/10.1128/AAC.01541-05>
8. Carattoli A., Zankari E., Garcia– Fernandez A., Voldby Larsen M., Lund O., Villa L., Aarestrup F., Hasman H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2014;58:3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-13>
9. Cosentino S, Voldby Larsen M, Møller Aarestrup F, Lund O. PathogenFinder–distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. *PLoS One*. 2013;8(10):e77302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077302>



10. Davis JJ, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Pusch GD, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Yoo H. PATtyFams: Protein Families for the Microbial Genomes in the PATRIC Database. *Front Microbiol.* 2016;7:118. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00118>
11. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
12. Grant JR, Enns E, Marinier E, Mandal A, Herman EK, Chen C, Graham M, Van Domselaar G, Stothard P. Proksee: in–depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research.* 2023;51(W1):W484–W492. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>
13. Harwood CR, Williams DM, Lovett PS. Nucleotide sequence of a *Bacillus pumilus* gene specifying chloramphenicol acetyltransferase. *Gene.* 1983;24(2–3):163–169. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90076-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90076-8)
14. Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, Frimodt-Møller N, Aarestrup FM. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2014;52(1):139–146. <https://doi.org/10.1128/JCM.02452-13>
15. Heir E, Sundheim G, Holck AL. The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *J Appl Microbiol.* 1999;86(3):378–388. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00672.x>
16. Holland BR, Huber KT, Dress A, Moulton V. Delta plots: A tool for analyzing phylogenetic distance data. *Mol. Biol. Evol.* 2002;19:2051–2059. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004030>
17. Iqbal S, Vollmers J, Janjua HA. Genome Mining and Comparative Genome Analysis Revealed Niche-Specific Genome Expansion in Antibacterial *Bacillus pumilus* Strain SF-4. *Genes (Basel).* 2021;12(7):1060. <https://doi.org/10.3390/genes12071060>
18. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol.* 2017;37:67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>
19. Langille MG, Hsiao WW, Brinkman FS. Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(5):373–382. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2350>
20. Lee I, Kim YO, Park SC, Chun J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66:1100–1103. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>
21. Medema MH, Blin K, Cimermancic P, De Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R. antiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:339–346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
22. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics.* 2013;14:A.60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>



23. Meier-Kolthoff JP, Sardà Carbasse J, Peinado-Olarte RL, Göker M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome– based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acid Res.* 2022;50:D801–D807. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab902>
24. Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
25. Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, Mallonee AB, Bergman NH, Koren S, Phillippy AM. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol.* 2016;17(1):132. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-x>
26. Qureshi KA, Seroor M, Al-Masabi A, Saykhan MA, Mutairi YA, Elhassan GO, Khan RA. Bio-characterizations of some marine bacterial strains isolated from mangrove sediment samples of four major cities of Saudi Arabia J. *Environ. Biol.* 2020;41:1003–1012. <https://doi.org/10.22438/jeb/41/5/MRN-1317>
27. Shtenikov MD, Ostapchuk AM, Ivanytsia VO. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black sea sediments *Мікробіологія і біотехнологія.* 2018;3:82–89. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3\(43\).142582](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.3(43).142582)
28. Skinnider MA, Dejong CA, Rees PN, Johnston CW, Li H, Webster ALH, Wyatt MA, Magarvey NA. Genomes to natural products: PRediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM). *Nucleic Acids Research.* 2015;43(20):9645–9662. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1012>
29. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014;30(9):1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
30. Thompson MK, Keithly ME, Harp J, Cook PD, Jagessar KL, Sulikowski GA, Armstrong RN. Structural and chemical aspects of resistance to the antibiotic fosfomycin conferred by FosB from *Bacillus cereus*. *Biochemistry.* 2013;52(41):7350–7362. <https://doi.org/10.1021/bi4009648>
31. van Heel AJ, Jong Ade, Song C, Viel JH, Kok J, Kuipers O P, BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research.* 2018;46(W1):278–281. <https://doi.org/10.1093/nar/gky383>
32. Wattam AR, Brettin T, Davis JJ, Gerdes S, Kenyon R, Machi D. Assembly, Annotation, and Comparative Genomics in PATRIC, the All Bacterial Bioinformatics Resource Center. *Comparative Genomics. Methods Mol Biol.* 2018:79–101.
33. Ziganshina EE, Mohammed WS, Shagimardanova EI, Shigapova LH, Ziganshin AM. Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* strain EZ-C07 isolated from digested agricultural wastes. *BMC Res Notes.* 2018;11(1):606. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3710-1>

Стаття надійшла до редакції 14.04.2025 р.

