

Міністерство освіти і науки України
Львівський національний університет імені Івана Франка
Кафедра генетики та біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА МАГІСТРА

на тему:

СПОНТАННІ МУТАНТИ
***STREPTOMYCES VIRIDOSPORUS* ATCC14672**
З ПОРУШЕННЯМ МОРФОГЕНЕЗУ

студента VI курсу, групи БЛТ-21М
спеціальності 162 – «Біотехнології та біоінженерія»

Стецика Романа Володимировича

Керівник: д.б.н., проф. Осташ Б.О.

Рецензент: доц., к. б. н. ТАРНОВСЬКА А.В.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Рід <i>Streptomyces</i> : таксономічне положення.....	6
1.2. Філогенетична позиція стрептоміцетів на дереві бактерій.....	8
1.3. Поширення <i>Streptomyces</i> , екологічне значення.....	15
1.4. Геноміка <i>Streptomyces</i>	20
1.5. Морфологічна і генетична нестабільність <i>Streptomyces</i>	28
1.6. <i>Streptomyces viridosporus</i> ATCC 14672.....	33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	39
2.1. Штами бактерій, використані у роботі.....	39
2.2. Реактиви.....	40
2.3. Умови культивування <i>Streptomyces viridosporus</i> ATCC 14672.....	41
2.4. Підготовка інокуляту та варіанти посіву культур.....	42
2.5. Морфологічний та фізіологічний аналіз колоній.....	44
2.6. Клонування колоній.....	44
2.7. Дослідження утворення морфологічно відмінних ліній <i>Streptomyces viridosporus</i> ATCC 14672.....	46
2.8. Методи тестування антибіотичної активності <i>Streptomyces viridosporus</i> ATCC 14672.....	46
2.9. Методика отримання моеноміцину з штаму №7 та WT.....	49
2.10. Дослідження обміну метаболітами.....	50
2.11. Виділення ДНК та підготовка до секвенування.....	51
2.12. Біоінформатичний аналіз результатів секвенування геномів морфологічно відмінних ліній штаму ATCC 14672.....	53
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ	56
3.1. Виявлення природної морфологічної мінливості колоній <i>Streptomyces viridosporus</i> ATCC 14672.....	56

3.2. Кількісна оцінка утворення морфологічно відмінних ліній <i>Streptomyces viridosporus</i> ATCC 14672 із вихідної культури.....	61
3.3. Стабільність спадковості морфологічних ознак у повторних пасажах.....	62
3.4. Оцінка антибіотичної активності та чутливості морфотипів.....	64
3.5. Вплив ко – культивування морфологічно відмінних ліній на спороутворення	72
3.6. Біоінформатичний аналіз результатів секвенування геномів морфологічно відмінних ліній <i>Streptomyces viridosporus</i> ATCC 14672.....	74
ВИСНОВКИ	88
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	89
ДОДАТКИ.....	96

ВСТУП

Бактерії роду *Streptomyces* є одним із найбільше вивчених зараз родів актиноміцетів. Вони є головним джерелом природних антибіотиків, що широко застосовуються у медицині та сільському господарстві. Серед них помітне місце займає *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672, відомий як штам-продуцент моеноміцину А — унікального антибіотика, що має широкий спектр антимікробної дії.

Актуальність теми зумовлена потребою дослідження природної мінливості у штамів, що синтезують антибіотики. Стрептоміцети славляться високим ступенем генетичної мінливості. Це означає, що їхні колонії можуть відрізнятися за спорулюванням, пігментацією та рівнем антибіотичної активності. Дослідження такої мінливості є важливим для створення нових штамів-продуцентів з підвищеною антибіотичною активністю та покращеними властивостями росту.

Мета: Дослідити за лабораторних умов природну мінливість штаму-продуцента моеноміцину *Streptomyces viridosporus* ATCC14672 за морфологічними, фізіологічними та геномними ознаками.

Об'єкт дослідження: морфофізіологічна і генетична мінливість колоній стрептоміцетів.

Предмет дослідження: мінливість колоній колекційного штаму дикого типу *Streptomyces viridosporus* ATCC14672 за спорулюванням, пігментацією та здатністю продукувати антибіотики при вирощуванні на твердих середовищах, будовою генома.

Для досягнення мети поставлені завдання:

1. Дослідити, чи виявляє штам ATCC14672 природну мінливість за морфологічними ознаками на агаризованих середовищах.

2. Для виявлених морфологічно відмінних ліній штаму дослідити стабільність успадкування морфотипу.
3. Дослідити антибіотичну активність та антибіотикорезистентність морфологічно відмінних ліній штаму.
4. Дослідити вплив ко-культивування пізніх морфотипів на твердих середовищах на їхню здатність спорулювати.
5. Провести біоінформатичний аналіз результатів секвенування морфологічно відмінних ліній та штаму дикого типу *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Рід *Streptomyces*: таксономічне положення

Рід *Streptomyces* належить до домену Bacteria, типу Actinobacteria, класу Actinobacteria, порядку Streptomycetales та родини Streptomycetaceae. Це найбільший рід серед актинобактерій, до якого належить понад 900 описаних видів. Для всіх актиномицетів є характерною складна морфологічна диференціація. Вона розпочинається з проростання спори, що дає поштовх до утворення субстратного міцелію. На цьому етапі розвитку відбувається активне нагромадження біомаси. Далі із субстратного міцелію починає розвиватись повітряний міцелій. На цьому етапі диференціації запускається біосинтез антибіотиків. Життєвий цикл закінчується утворенням унігеномних спор [10].

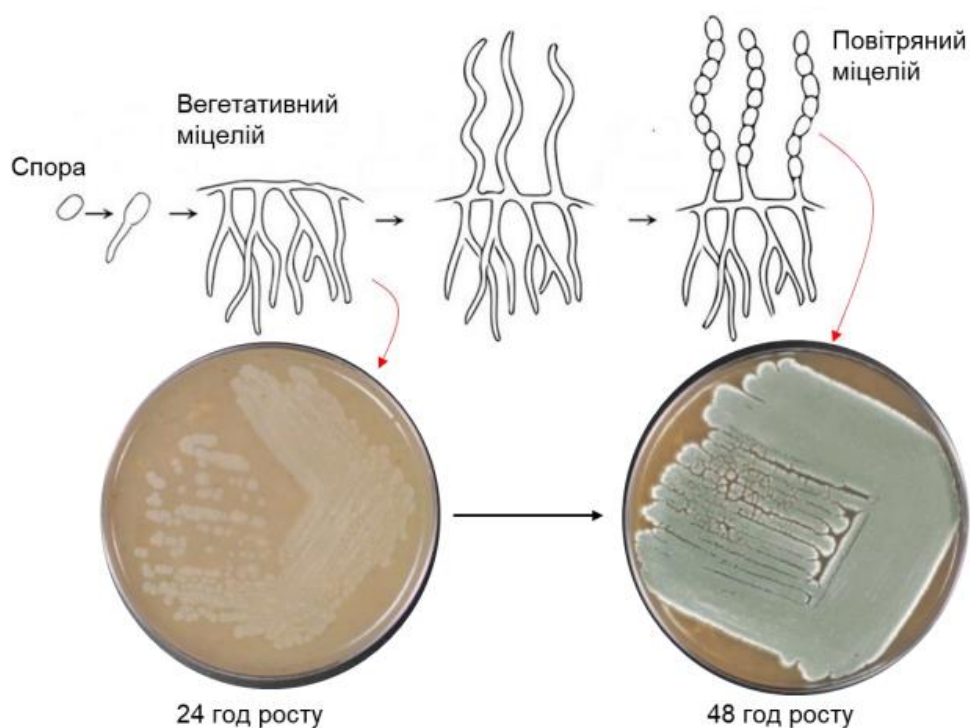


Рис. 1.1. Схематичне зображення процесу проростання спори з формуванням повітряного міцелію. Для ілюстрування внизу наведені фотографії газонів *Streptomyces viridosporus* ATCC14672 на 24 та 48 год культивування, що відповідають стадіям вегетативного та повітряного міцелію

Усі етапи у циклі розвитку стрептоміцетів підлягають надзвичайно складній генетичній регуляції з боку різних регуляторних елементів, розташованих на різних ієрархічних рівнях [1].

Історично рід *Streptomyces* був запропонований в 1943 році Зельманом Ваксманом та Генріці [52], вони вивчали ґрунтові мікроорганізми які мали здатність продукувати антибіотики. З тих пір цей рід займає провідне місце у мікробіологічних дослідженнях завдяки своїй здатності продукувати понад 70% відомих на сьогодні природних антибіотиків, включаючи такі сполуки, як тетрациклін, стрептоміцин, моеноміцин, еритроміцин та інші [20,50].

Таксономія роду довгий час базувалась на морфологічних та біохімічних характеристиках, проте з розвитком молекулярних методів, таких як секвенування 16S рРНК та порівняльної геноміки, було значно переглянуто класифікацію багатьох видів [23]. Одним із найбільш важливих і добре вивчених видів у цьому контексті є *Streptomyces coelicolor* A3(2) — це модельний організм, геном якого став вперше повністю секвенованим із актиноміцетів. Також *Streptomyces coelicolor* A3(2) слугує референтною точкою при дослідженні інших представників роду [24].

Сучасна таксономія роду *Streptomyces* враховує не тільки генетичну спорідненість, але й наявність морфогенетичних особливостей, кластерів генів спеціалізованого метаболізму, а також екологічні ніші. Наприклад, *Streptomyces albidoflavus* J1074, який тісно пов'язаний з історичною групою *S. albus*, був реасоційований до нового таксономічного статусу на основі філогенетичного аналізу. Це підкреслює те, наскільки є важливим застосування сучасних біоінформатичних підходів у систематиці цього роду. Філогенетичний аналіз дає змогу розрізнити види з більшою точністю, аналізуючи для цього амінокислотні та нуклеотидні послідовності [13].

Окрім фізіологічних й морфологічних критеріїв, для таксономії мікроорганізмів використовують різноманітні показники, а саме: хімічний склад клітини, клітинної мембрани та клітинної стінки (хемотаксономія). Саме методи

хемотаксономії довгий час використовувалися для розрізнення стрептоміцетів та інших актинобактерій [24]. До аналітичних методів хемотаксономії входять: хроматографія, спектроскопія та електрофорез, а основну увагу звертають на наявність менахінонів, полярних ліпідів, вуглеводів, амінокислот, жирних і міколових кислот у мембрані, клітинній стінці чи клітині [53].

Рід *Streptomyces* займає центральне місце у мікробіології, біотехнології та фармакології не лише завдяки своєму біосинтетичному потенціалу, але й через екологічну роль в ґрунтових екосистемах, де *Streptomyces* виступає як супресор патогенів та деструктор органіки [43].

1.2. Філогенетична позиція стрептоміцетів на дереві бактерій

Однією з найдавніших проблем біоінформатики є реконструкція еволюційних зв'язків (філогеній) з послідовностей ДНК. Особливо важливими для порівняльної геноміки та розуміння селективного тиску в швидкозмінних одноклітинних організмах є мікробні філогенії; мікробна систематика також залежить від точного визначення складного мікробного дерева життя. Таксономічне призначення нещодавно секвенованих геномів, виявлення горизонтально перенесених генів та дослідження відбору генів, шляхів та мутацій у патогенів під час спалахів захворювань залежать від філогенетичних досліджень цілого геному. Оцінка мікробного біорізноманіття цілих спільнот та його кореляції зі змінними навколишнього середовища або захворюваннями людини також вимагає точних філогенетичних дерев [45].

До середини 1970-х років дослідники еволюції живих організмів вивчали походження видів тварин та рослин, чия поява і розвиток охоплюють щонайбільше останніх 20 % еволюційної історії Землі. Міцною основою для їхньої таксономії були дослідження морфології та детальний опис скам'янілих решток давніх організмів. Еволюція мікроорганізмів, які присутні на Землі протягом більшої частини її існування, довгий час залишалася поза увагою вчених. Проте розвиток революційних методів дослідження амінокислотних і

нуклеотидних послідовностей дав змогу не тільки вивчати філогенію мікроорганізмів, але й відстежувати еволюційні зв'язки впритул до появи останнього спільного предка всіх живих організмів. Врешті було запропоновано розділити живі організми на три домени: Археї, Бактерії і Евкаріоти, що найточніше відповідає структурі еволюційного процесу живих організмів [54].

Сучасні філогенетичні дерева є відображенням ієрархічної класифікації, виникнення якої передувало еволюційному вченню. У «Походженні видів» Ч. Дарвіна за допомогою таксономічних дерев можна було групувати організми за чіткою ієрархією: види об'єднувалися в роди, роди в родини, родини в ряди і так далі. Дарвін дійшов до висновку, що ці категорії пояснюють походження та напрямки еволюції організмів. Отже, ось таким чином таксономічне дерево стало філогенетичним. В основі ранніх підходів до створення еволюційних дерев (філогеній) лежали морфологічні та метаболічні ознаки організмів. Проте із появою методів секвенування біологічних послідовностей істотно покращилась якість філогеній, адже вони допомогли відкинути необхідність прямого спостереження за організмами і також дозволили використовувати послідовності нуклеотидів чи амінокислот як маркери спорідненості.

На рисунку [1.2] зображено філогенетичне дерево, що використовує генетичні послідовності з трьох доменів живої природи — бактерій, архей та еукаріотів. Дерево створено на основі послідовностей з 1011 геномів організмів, що належать до різних класів. Для філогенетичної реконструкції було об'єднано 16 генів рибосомних білків. Порівняно з використанням одного гена (наприклад, найпоширенішого маркера, гена 16S рРНК), цей метод створює дерево вищої якості. Використання рибосомних білків допомагає запобігти артефактам, що виникають під час реконструкції дерев за допомогою генів з непов'язаними функціями, які могли еволюціонувати по-різному, як з точки зору частоти певних типів мутацій порівняно з іншими, так і з точки зору швидкості накопичення мутацій [22].

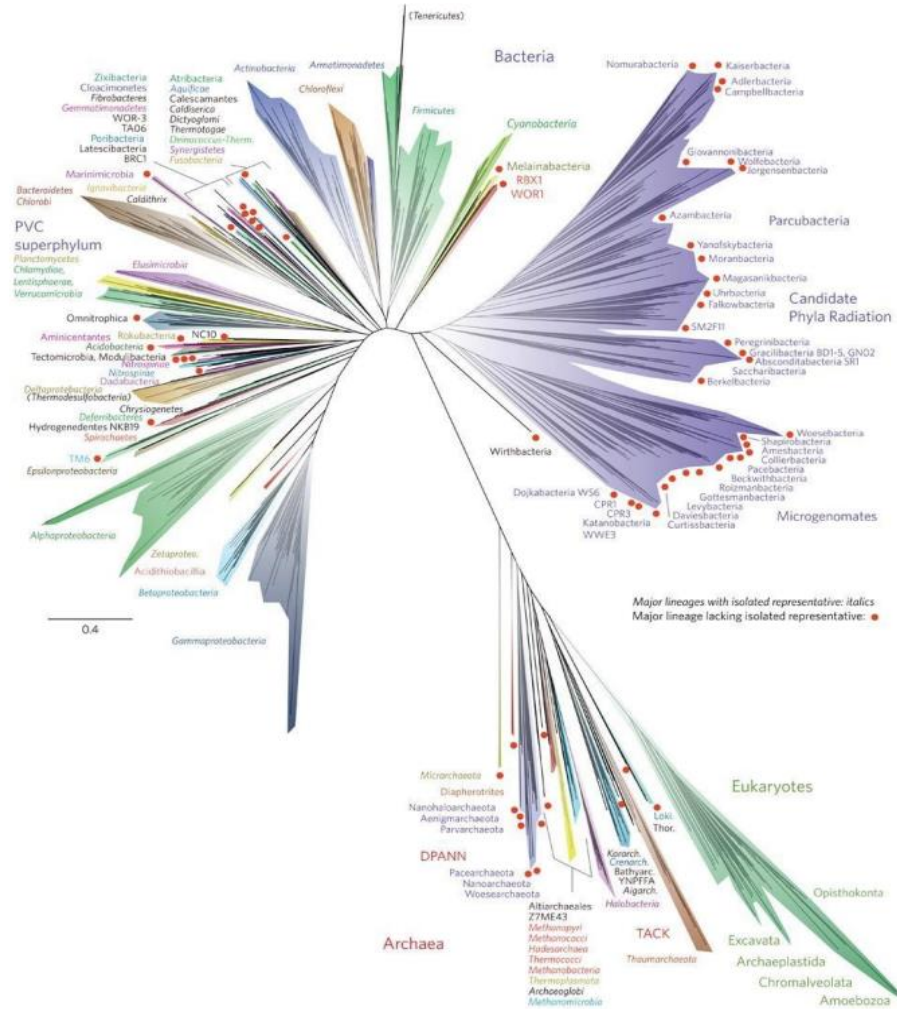


Рис. 1.2. Сучасна реконструкція дерева життя, що охоплює представників трьох доменів: Архей, Бактерій та Еукаріот. У дерево інтегровано 92 бактеріальні типи, 26 типів архей та п'ять еукаріотичних супергруп. Добре охарактеризовані таксони подані курсивом. Групи без ізольованих культур позначені звичайним шрифтом і виділені червоними маркерами. Назви *Tenericutes* та *Thermodesulfobacteria* подані в дужках, що відображає їхнє розгалуження відповідно в межах *Firmicutes* та *Deltaproteobacteria*. Окремим кольором виділено тип CPR (*Candidate Phyla Radiation*), який повністю складається з некультивованих організмів, і для якого таксономічна класифікація нижчих рівнів наразі перебуває на етапі уточнення. Ілюстрацію адаптовано з роботи [22]

Концептуально це філогенетичне дерево [рис. 1.2.] цікаве тим, що багато його клад репрезентують організми, які не культивуються в лабораторних умовах. Широка розповсюдженість таких організмів стала відомою завдяки появі метагеномних підходів. Некультивовані організми часто мають невеликі геноми та обмежені метаболічні можливості, а деякі з них є симбіонтами. Більшість з цих клад формують окремий кластер і навіть можуть претендувати на відокремлення як новий окремий тип.

Але такий підхід не є ідеальним через те, що не дає змоги розрізнити філогенетично близькі організми. Ізоляти можуть бути ідентичними за послідовностями генів рРНК малої субодиниці рибосоми, проте відрізнятися за іншими критеріями (послідовністю білкових генів та фізіологічними характеристиками) настільки, що їх можна віднести до різних видів [6].

Як показала робота [2], використання консервативних рибосомних маркерів 5S, 16S, 23S рДНК не підходить для встановлення філогенії усередині субклад дерева життя (наприклад, актинобактерій). Існують випадки, коли геном містить копію маркерного гена, що дуже відрізняється від решти генів, що можна витлумачити як наслідок горизонтального перенесення [6].

Наприклад Нікола Сегата з колегами [45] розробили PhyloPhlAn – це новий метод визначення філогенії та передбачуваної таксономії мікробів із використанням >400 білків, оптимізованих з 3737 геномів. Метод PhyloPhlAn допоміг покращити таксономічну точність для існуючих а також нещодавно секвенованих геномів. За допомогою цього методу науковці виявили 157 помилкових міток, виправивши 46 та розмістивши або уточнивши 130 нових геномів.

Білки вибиралися із 2780 бактеріальних та 107 архейних геномів, та кожен тестувався на консервативність серед понад 10 мільйонів генів. Науковці оцінювали філогенетику, побудовану з 500 білків, що охоплюють найбільшу різноманітність, виміряну за допомогою попереднього філогенетичного аналізу на основі 16S. Філогенетичні дерева генеруються із підпослідовностей цих

білків, що об'єднують їхні найбільш інформативні амінокислотні позиції, кожна з яких вирівнюється окремо, та реконструюються в дерева [45].

Як приклад, за допомогою такого методу було виведене філогенетичне дерево типу *Actinobacteria* [рис. 1.3.].

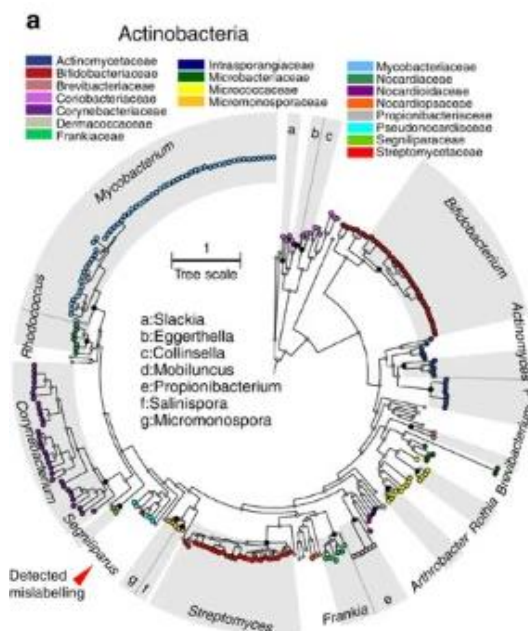


Рис. 1.3. Піддерево типу *Actinobacteria*. Одним кольором позначено представників однієї родини. Всі 19 родин згруповані послідовно. Цього неможливо було б досягти лише за допомогою послідовностей генів *16S* [45]

Реконструйовані на основі цілих геномів дані дерев показують, що рід *Streptomyces*, як і низка інших, мають немонофілетичне походження [40]. Родина *Streptomycetaceae* згідно з даними [40] включає в себе роди *Streptomyces*, що є типовим, *Allostreptomyces*, *Kitasatospora*, *Streptacidiphilus*. Статус родів *Kitasatospora*, *Streptacidiphilus* потребує уточнення.

Також важливим чинником еволюції у прокариот є горизонтальне перенесення генів. Згідно зі сучасними даними [38], у роді *Streptomyces* латеральне перенесення генів – це нечасте явище, яке траплялося з частотою приблизно 1 раз на 100 тис. років. Ці результати дещо суперечать усталеному уявленню про швидку еволюцію бактерій за рахунок обміну генами.

Філогенетичне дерево на основі 94 генів домашнього господарства [рис. 1.4.] виявило групування 88 видів стрептоміцетів у двох основних монофілетичних кладах (клада I і клада II), інші 34 види не належали до цих клад та були згруповані окремо.

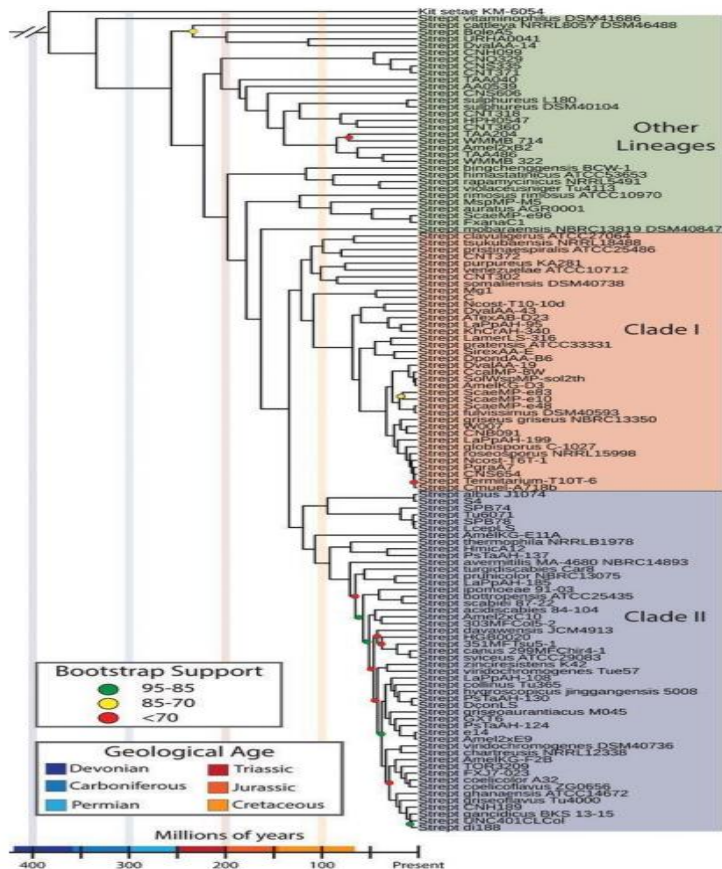


Рис. 1.4. Філогенія на основі геномів і молекулярний годинник для роду *Streptomyces*. Мультилокусна філогенія *Streptomyces* на основі TIGRFAM з використанням 94 універсальних консервативних генів домашнього господарства. *Streptomyces* і *Kitasatospora* скорочено названо Strept і Kit відповідно. Адаптовано з [38]

Більшість ізолятів *Streptomyces* із морського середовища виявлено в більш давніх лініях. Це свідчить про можливе морське походження роду. Крім того, багато штамів у кладі I, до якої належить *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 є виділені з зразків, які пов'язані з комахами.

Разом з результатами [38] надійність результатів підтверджена ще одною роботою, де використовували 575 корових генів із 93 стрептоміцетів [37]. Реконструйоване таким способом дерево також дозволило чітко розрізнити три групи [рис. 1.5].

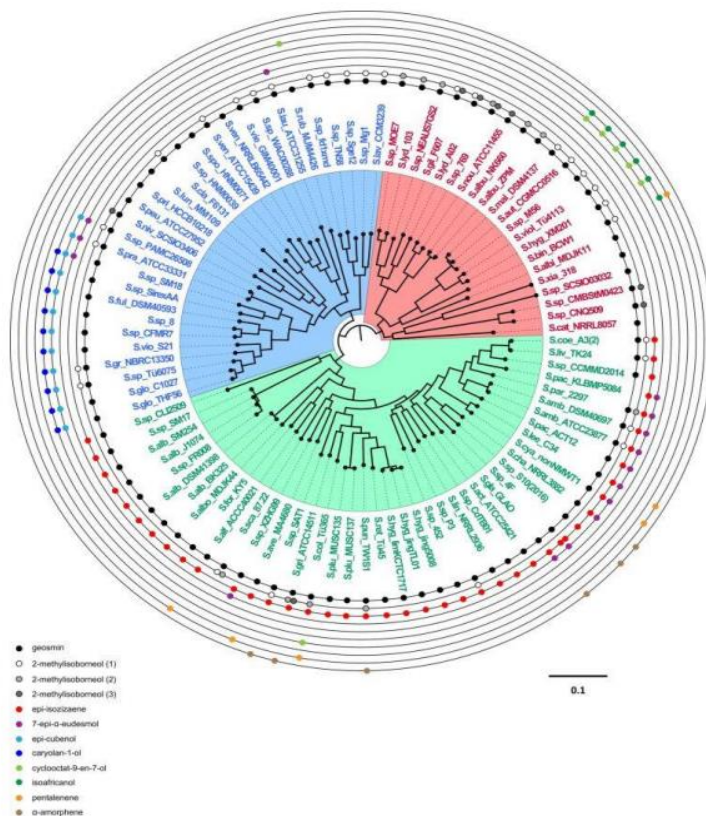


Рис. 1.5. Філогенетична реконструкція на основі 93 видів стрептоміцетів з повністю секвенованими геномами. Використано 575 консервативних однокопійних ортологів. Види є розділеними на три основні групи. Вони позначені різними кольорами. Взято з роботи [37]

Таким чином, застосування сучасних методів філогеномного аналізу значно поглибило розуміння еволюційних взаємозв'язків у межах типу Actinobacteria та дозволило переосмислити внутрішньородові відносини роду Streptomyces. На відміну від традиційних маркерів, зокрема генів рибосомних маркерів: 5S, 16S, 23S рДНК, які не забезпечували достатньої роздільної

здатності, мультилокусні підходи та інструменти на кшталт PhyloPhlAn дали можливість виявити немонофілетичність роду *Streptomyces*, переглянути таксономічний статус близьких таксонів (*Kitasatospora*, *Streptacidiphilus*, *Allostreptomyces*) та простежити давнє розходження морських і комахо – асоційованих ліній. Інтеграція цілісних геномних даних та великої кількості консервативних білкових послідовностей дає надійність отриманих філогенетичних реконструкцій, тому це робить їх хорошим інструментом для еволюційних біологів та систематиків а також практичною основою для біотехнологів і біоінженерів у пошуку нових біоактивних сполук.

1.3. Поширення *Streptomyces*, екологічне значення

Streptomyces є одними із важливих та добре вивчених родів бактерій. Як сапрофіти, які ростуть у ґрунті та водних відкладеннях, стрептоміцети відіграють вирішальну роль у мінералізації стійких полімерів, таких як целюлоза, хітин та крохмаль, які є результатом загибелі членистоногих, рослин і грибів. Маючи багатоклітинний спосіб росту колонії взаємопов'язаних гіф поширюються на велику територію, яка може мати різні умови в різних частинах колонії. Також стрептоміцети є головним джерелом натуральних продуктів, які використовуються у сільському господарстві і медицині [43]. Ґрунти з нейтральною або слабколужною реакцією є найбільш сприятливими для розвитку цих бактерій. *Streptomyces* можуть виживати в екстремальних умовах завдяки спороутворенню, воно дозволяє їм витримувати ультрафіолетове випромінювання, високі температури, сухість і дефіцит поживних речовин.

Деструкція органічних полімерів. Серед всіх ґрунтових мікроорганізмів, *Streptomyces* займають важливе місце завдячуючи своїй здатності до глибокої деструкції складних полімерів: лігніну, целюлози геміцелюлози, крохмалю, хітину. Це забезпечується синтезом багатьох гідролітичних ферментів, серед яких: протеази, целюлази, ліпази, хітинази, амілази які активно секретуються в

навколишнє середовище. Наприклад, *S. viridosporus* ATCC 14672 проявляє високу активність до лігнін-деструкції. Це має велике значення у природному кругообігу вуглецю, а також в потенційному біотехнологічному використанні при біообробці лігноцелюлозних відходів [43].

S. coelicolor також є модельним об'єктом вивчення метаболізму актинобактерій, який суттєво відрізняється від вивчених прецедентів [19]. Це викликано особливою екологічною нішею, яку займають стрептоміцети. Як сапрофіти, *S. coelicolor* харчуються в більшості рештками, які збіднені на азот та фосфор, але багаті на вуглеводи. Тому стрептоміцети багато "інвестують" у регуляцію шляхів поглинання та катаболізму вуглеводів [18]. Водночас більшість стрептоміцетних шляхів катаболізму азотновмісних сполук – є конститутивною за типом експресії. Зустрічаються багато дуплікацій генів первинного метаболізму. Це сприяє посиленому синтезу певних сполук, які слугують будівельними блоками для спеціалізованих метаболітів [44].

Синтез антибіотиків. Важливою біологічною функцією роду *Streptomyces* є їхня здатність до синтезу широкого спектра вторинних метаболітів, а саме антибіотиків. Ця здатність наявна через велику кількість кластерів біосинтетичних генів (КБГ) у геномах стрептоміцетів, сигнальними молекулами, глобальними регуляторами та складною системою каскадної регуляції синтезу [1].

Початок продукції антибіотиків у стрептоміцетів збігається або передуює розвитку повітряного міцелію під час їхнього росту на твердих середовищах. У рідкій культурі запуск синтезу антибіотиків розпочинається після входу у стаціонарну фазу росту. Це зумовлено зниженням кількості доступних поживних ресурсів у середовищі [35]. У переважній більшості випадків гени біосинтезу антибіотиків згруповані у кластери, що відрізняються за розмірами від кількох до більше, ніж 100 т.п.н. [1].

Кожен кластер включає структурні гени, гени експорту, регуляторні елементи, гени стійкості до антибіотика і ферменти постсинтетичної

модифікації. Класичним прикладом є тое-кластери у *S. viridosporus* ATCC 14672, що відповідають за синтез моеноміцину — природного, фосфоровмісного, високомодифікованого глікозиду, що містить ліпідний ланцюг ізопренового походження [1].

Кластери можуть бути компактними або формувати суперкластери, як наприклад у *S. pristinaespiralis*, де поруч розміщені гени біосинтезу пристинаміцинів PI і PII. Координація синтезу цих сполук дозволяє досягти синергії в біологічній дії.

Регуляція синтезу антибіотиків у *Streptomyces* є багаторівневою і охоплює:

- Шлях-специфічні регулятори (CSR) – контролюють продукцію конкретного метаболіту та є локалізованими в межах кластерів;
- Глобальні регулятори – діють на декілька кластерів одночасно (наприклад, AdpA, AbsB, BldA), також вони координують метаболічну активність та морфогенез ;
- Молекулярні сигнали – γ -бутиролактони активують транскрипцію мовчазних кластерів, а також слугують хімічними індикаторами щільності популяції.

Особливо важливим є білок AdpA, він є центральним у мережі регуляції *S. coelicolor* і *S. viridosporus* —активує гени морфогенезу (наприклад, sapB), та спеціалізованого метаболізму [1].

Майже усі з досліджених кластерів генів, відповідальних за формування вторинних метаболітів у стрептоміцетів, містять один, рідше два і більше, CSR, які слугують кінцевим етапом передачі регуляторних сигналів, як внутрішньоклітинних, так і з-поза її меж. Ці регулятори виконують роль біологічних “антен” [1].

Не всі кластери генів біосинтезу антибіотиків містять CSR, як і у випадку продукції МмА у штамі *S. viridosporus*. Це наводить автора Макітринського Р. на думку, що такі незвичні біосинтетичні шляхи можуть регулюватися доступністю окремих сполук – “будівельних” блоків, з яких komponується антибіотик.

Регуляція може здійснюватися елементами каскадної мережі, які розташовуються на вищих рівнях [1].

Більшість КБГ у геномах стрептоміцетів та інших родів актинобактерій є мовчазними. Це означає, що їхні гени не транскрибуються за стандартних лабораторних умов, або транскрибуються на дуже низькому рівні, що недостатній для утворення природної сполуки.

Використання різноманітних генетичних підходів, таких як мутагенез, перенесення кластерів у гетерологічні хости та надекспресія глобальних регуляторів, дозволяє активувати "мовчазні" кластери та підвищувати продукцію антибіотиків.

Зокрема, у дисертації Макітринського Р.П. показано, що надекспресія *adpAgh* та *absBgh* у штамі *S. viridosporus* суттєво підвищує синтез моеноміцину А (МмА) [1].

Морфогенетичний цикл *Streptomyces* є тісно пов'язаним з продукцією антибіотиків. Це зумовлено тим, що початок спороутворення збігається з активацією вторинного метаболізму. Такий процес не є випадковістю. Хімічні сигнали та генні мережі, які керують спеціалізованим метаболізмом і морфогенезом мають багато спільного, що забезпечує координацію морфологічної та метаболічної диференціацій [36,31,8]. Припускається, що завдяки такій координації відбувається захист стрептоміцетної колонії у ході морфогенетичних перетворень, коли частковий лізис вегетативного міцелію робить стрептоміцета особливо вразливим перед хижаками у ґрунтових екосистемах [10]. Так, визначальною роллю у морфогенетичному циклі є так звані *bld* гени [рис. 1.6.]. Вони також задіяні у регулюванні спеціалізованого метаболізму [25].

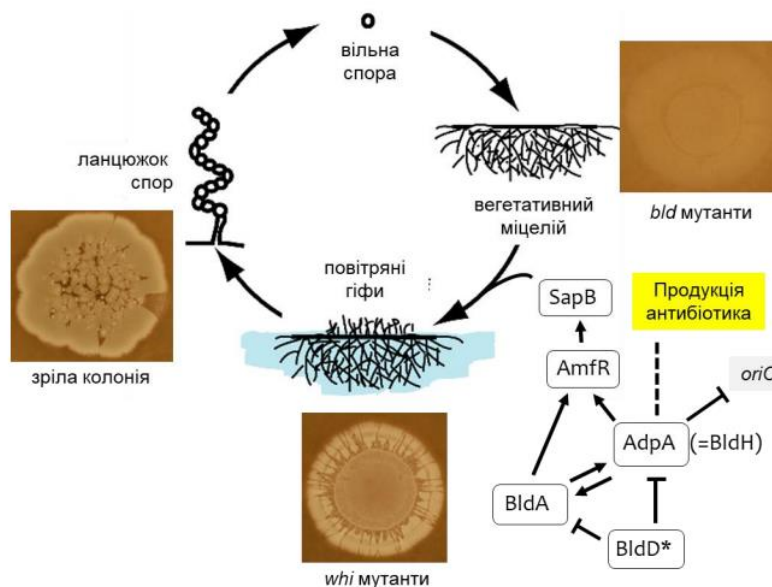


Рис. 1.6. У життєвому циклі колонії *Streptomyces* є велика група генів які контролюють перехід від вегетативного до повітряного росту. Вибрані елементи цієї групи наведені на цьому рисунку. Стрілки вказують на позитивні або активаційні ефекти; лінії з перпендикулярними закінченнями є позначеннями для негативних або репресорних ефектів; пуктирна лінія позначає репресорний або активаторний ефект (опосередкований або безпосередній) на продукцію антибіотика. Транскрипційний фактор AdpA (також відомий як BldH) – це важлива частина цієї регуляторної мережі. Саме AdpA (поміж інших подій) веде до експресії морфогенетичного білка SapB. Він також впливає на продукцію антибіотика та репресує реплікацію в *S. coelicolor*. Іншими ключовими гравцями у формуванні повітряних гіфів є BldA та BldD. BldA – лейцил тРНК (tRNA^{Leu} UAA), єдина яка може декодувати рідкісний кодон UUA в межах кодувальних послідовностей генів *adpA* та *amfR*. BldD – є майстром-регулятором морфогенезу *Streptomyces*, який, у комплексі із c-di-GMP (BldD*) репресує *adpA*. Схема морфогенезу яка описана вище ґрунтується головно на вивченні *S. coelicolor*. Схему ілюструють фотографії колоній штамів *S. viridosporus* ATCC14672 заблокованих на різних стадіях життєвого циклу (*bld* й *whi* мутанти)

Отже, біосинтез антибіотиків – складний ензиматичний процес. Його регуляція тісно переплетена із морфологічною диференціацією бактерій. Ця регуляція забезпечується взаємодією білків а також їхніх комплексів, малими регуляторними молекулами тощо, що поєднується з доступністю і типом поживних речовин, на яких відбувається ріст мікроорганізмів.

1.4. Геноміка *Streptomyces*

Загальні властивості геному стрептоміцетів.

Геноми стрептоміцетів відрізняються від інших бактерій. Він складається з великої лінійної хромосоми з кінцевими інвертованими повторами та розміром від 6 до 12 Мб, що кодує від 5300 до 11 000 білків. Наприклад типовий бактеріальний геном має розмір 5 Мб та кодує приблизно 5000 білків на кільцевій хромосомі. Великий розмір геному стрептоміцетів – це результат горизонтального переносу генів (ГПГ), дуплікації генів та рекомбінації, а їх еволюційний шлях частково пояснюється складним життєвим циклом, який включає кілька стадій розвитку [39].

Геном стрептоміцетів характеризується унікальною топологічною організацією, яка поєднує структурну стабільність центральної частини хромосоми та високу мінливість її периферійних ділянок. Лінійна хромосома представників роду *Streptomyces* складається з так званого «core»-сегмента, де зосереджені гени основного метаболізму, а також плечей, які містять переважно гени вторинного метаболізму, ферменти з вуглеводною активністю (CAZymes), а також відкриті рамки зчитування (ORF), що містять рідкісний кодон ТТА. Просторовий розподіл такого типу забезпечує баланс між генетичною стабільністю і еволюційною гнучкістю, дозволяючи стрептоміцетам адаптуватися до різноманітних екологічних ніш. [39]

Аналіз 213 геномів *Streptomyces* показав, що кількість кластерів генів біосинтезу вторинних метаболітів (smBGC) коливається від 16 до 53, у середньому становлячи близько 31 кластер на геном, тобто майже 12% усіх генів.

Найпоширенішими серед них є терпенові, сидерофорні, RiPP-подібні, ектоїнові та полікетидні кластери (PKS I–III), а також кластери непептидних синтетаз (NRPS). Переважання таких кластерів у периферійних ділянках геному свідчить про їхню локалізацію в зонах активної рекомбінації та горизонтального переносу генів, що є джерелом появи нових біосинтетичних шляхів і, відповідно, нових сполук природного походження [39].

Особливу увагу привертають ORF, що містять рідкісний кодон TTA, пов'язаний із регуляцією розвитку та продукцією вторинних метаболітів. У середньому геноми *Streptomyces* містять близько 177 таких ORF. Вони є серед генів транскрипційних регуляторів, сигнальних білків та ензимів, пов'язаних із синтезом метаболітів. Оскільки TTA часто трапляється в горизонтально перенесених генах, це свідчить про його роль у контролі адаптивних змін. Консервативність частини таких кодонів, зокрема в гені *adpA* — ключовому регуляторі морфогенезу — вказує на еволюційно збережену функціональність топологічних елементів геному [39].

Отже, топологічна організація геному стрептоміцетів має чітко виражену двокомпонентну структуру: центральна область забезпечує стабільність життєво необхідних процесів, тоді як периферійні плечі виступають як «еволюційні лабораторії», де відбувається накопичення і перебудова генетичних елементів, що сприяють утворенню нових метаболічних шляхів. Така просторово-функціональна архітектура є ключем до розуміння високої генетичної пластичності роду *Streptomyces* та його здатності продукувати надзвичайно широкий спектр біоактивних сполук [39].

Позахромосомні елементи стрептоміцетів є одими з ключових складових їхньої генетичної організації та забезпечують надзвичайну гнучкість геному, сприяють еволюційній адаптації та обміну корисними генетичними детермінантами між популяціями. Ці елементи є представленими переважно плазмідами, фагоподібними структурами а також інтегративними кон'югативними елементами, які можуть функціонувати як автономно, так і в

складі хромосоми. Їхня присутність забезпечує бактерії додатковими метаболічними можливостями, зокрема можливістю синтезувати вторинні метаболіти, переносити гени стійкості до антибіотиків і брати участь у горизонтальному перенесенні генів, що є основним механізмом еволюційної мінливості роду *Streptomyces* [47].

Серед позахромосомних елементів стрептоміцетів найкраще вивчені є кон'югативні плазмиди. Це автономні кільцеві молекули ДНК, здатні до самореplikації та перенесення між клітинами шляхом прямого контакту. Механізм кон'югації у *Streptomyces* є істотно іншим відносно класичного процесу, притаманного грамнегативним бактеріям: замість формування пілів відбувається утворення спеціалізованих міжклітинних мостів, через які передається однопіткова ДНК. Передача плазмиди зазвичай ініціюється розривом однієї з ниток у специфічній ділянці *oriT* за участі білків комплексу *tra*, після чого однопіткова форма переноситься у клітину – реципієнт і там реплікується до дволанцюгової [48].

Типові кон'югативні плазмиди стрептоміцетів, такі як pIJ101, pSAM2, pSVH1 та pJR1, містять гени, що відповідають за реплікацію (*rep*), стабільність (*par*), кон'югативний перенос (*tra*, *spd*, *spb*) та регуляцію експресії (*kor*, *traR*). Часто вони також несуть додаткові функціональні гени, зокрема детермінанти антибіотикорезистентності, фактори морфогенезу або гени вторинного метаболізму. Завдяки цьому кон'югативні плазмиди відіграють не лише роль мобільних елементів, а й виступають як регулятори фізіологічного стану клітини, які здатні впливати на продукцію антибіотиків і розвиток спор [21].

Важливою особливістю плазмід стрептоміцетів є їхня можливість до інтеграції у хромосому, що підвищує їхню стабільність у популяції і забезпечує тривале збереження генетичного матеріалу. Інтеграція зазвичай здійснюється через сайт-специфічну рекомбінацію у tRNA – генах або регіонах із повторюваними послідовностями. Такі інтегровані форми можуть пізніше

ексцизуватися та передаватися іншим клітинам, що робить плазмідні ключовим механізмом горизонтального обміну генами [21].

Особливий інтерес становлять інтегративні та кон'югативні елементи актиноміцетів (AICE, *Actinomycete Integrative and Conjugative Elements*), які поєднують властивості плазмід та фагів. Вони здатні вбудовуватися в хромосому господаря, інтегруватися у плазмідну форму, реплікуватися автономно та передаватися шляхом кон'югації. Таким чином, AICE – це самодостатні мобільні елементи, які не потребують допоміжних факторів для перенесення. Класичним прикладом є елемент pSAM2 з *Streptomyces ambofaciens*, який став моделлю для дослідження подібних систем [47].

Генетична структура AICE характеризується наявністю кількох функціональних модулів: інтеграційно – ексцизійного (ген *int*), реплікативного (*repSA*), кон'югативного (*traSA*, *spd*, *spb*) та регуляторного. Під час інтеграції інтеграза каталізує рекомбінацію між специфічними сайтами attP (на елементі) і attB (у хромосомі), утворюючи стабільну хромосомну копію. Ексцизія відбувається у відповідь на фізіологічні сигнали або стресові фактори, після чого AICE переходить у позахромосомну форму й починає реплікуватися автономно. Перенесення елемента відбувається у вигляді одониткової ДНК через спеціалізований транспортний комплекс, після чого у клітині – реципієнті відбувається реінтеграція в геном [47].

Інтегративні кон'югативні елементи мають суттєве еволюційне значення для актиноміцетів. Вони сприяють горизонтальному перенесенню великих генетичних кластерів, у тому числі тих, що кодують біосинтез антибіотиків, ферментів детоксикації, пігментів, або регуляторних білків. Такий механізм забезпечує формування мозаїчних геномів, у яких поєднуються ділянки різного еволюційного походження. AICE відіграють ключову роль у розширенні метаболічного потенціалу стрептоміцетів, тому що здатні поширювати гени, які пов'язані з утворенням нових біоактивних сполук, що має безпосереднє біотехнологічне значення [47].

Також важливе місце серед позахромосомних елементів *Streptomyces* займають велетенські лінійні плазміди. Ці елементи, розмір яких може сягати понад 300 кб, поєднують властивості автономних репліконів та мобільних генетичних платформ, здатних переносити великі фрагменти генетичного матеріалу. Їхня унікальна організація, на відміну від класичних кільцевих плазмід, визначає специфічні механізми реплікації, стабільності та інтеграції в геном клітини-хазяїна [47].

Механізм реплікації лінійної хромосоми стрептоміцетів: ділянка ініціації реплікації та теломерні ділянки. Реплікація ДНК є фундаментальним процесом, що забезпечує передачу генетичної інформації під час клітинного поділу та підтримання спадкової стабільності організмів. У бактерій з кільцевим геномом реплікація починається з точки початку реплікації – *oriC* (central origin) та закінчується коли дві реплікаційні вилки зустрічаються одна з одною в точці термінації реплікації *ter* (terminus) [7]. Плазміди та хромосоми у стрептоміцетів є лінійними. Через це їхнє самовідтворення має свої особливості. Перший етап у реплікації як лінійної та кільцевої хромосоми – це двонапрявлений синтез ДНК, що починається з центральної *oriC* та продовжується в напрямку теломер. Формування нових ниток ДНК завершується утворенням 3'-кінцевого виступу довжиною близько 300 н., що містить декілька паліндромних послідовностей із потенціалом до формування дуже стабільних вторинних структур [58]. Для більшості репліконів *Streptomyces* є характерними висококонсервативні архетипні (типові) кінці із паліндромними теломерними послідовностями. У плазмідах та хромосомах різних видів *Streptomyces* виявлено неархетипні кінці хромосом, які відрізняються послідовністю в паліндромах. Загалом є шість відомих класів теломерних послідовностей стрептоміцетів. [3]. У теломерах які є типовими, паліндром I, який складений з перших 13 нуклеотидних залишків, є комплементарним до частини паліндрому IV. Між цими двома паліндромами паліндроми II і III формують шпилькову структуру, що утримується неканонічним, проте стабільним зв'язком Г:А [рис. 1.7.], [58].

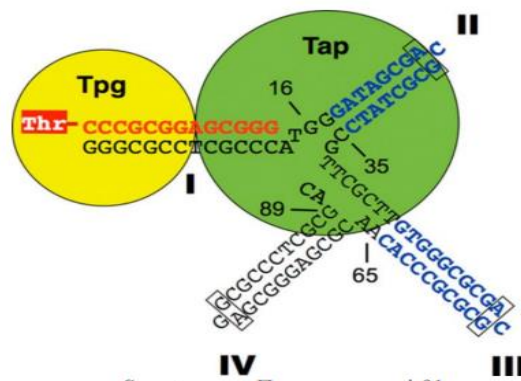


Рис. 1.7. Структура 3'-виступу типової теломери *Streptomyces*. Показано ділянки зв'язування білків Тар (зелений) і Трг (жовтий), а також формування праймера для синтезу теломерного кінця ДНК. На основі [58]

Для того, щоб запобігти втраті генетичного матеріалу після раунду реплікації лінійної хромосоми є механізм відновлення дволанцюгової структури кінців реплікону. Цей механізм є реалізований завдяки за участі асоційованих з теломерами високонсервативних білків Трг і Тар. Білок Трг специфічно зв'язується з 3'-кінцем одноланцюгового виступу, а ОН-група залишку треоніну 114 виконує роль субстрату для початку реплікації теломерної ділянки. Протеїн Тар є також необхідним при реплікації лінійних репліконів стрептоміцетів. Тар специфічно зв'язується з вторинними структурами теломер, та, можливо, рекрутує Трг до місця реплікації кінців [рис. 1.7.], [7, 56, 57].

Варто відзначити, що синтез кінців хромосоми *Streptomyces* здійснюється завдяки участі теломероасоційованих білків, попри відсутність у них ДНК-полімеразного мотиву. Додатковою характерною рисою цього процесу є необхідність двох видів праймерів: білкового (залишок треоніну 114 у білку Трг) і ДНК-праймера, який і синтезується Тар і Трг на основі білкового; РНК-праймер є не залученим до цього процесу. Після формування 13- нуклеотидного праймера подальше видовження нитки ДНК здійснюється завдяки іншим ферментам.

Полімеразна активність теломероасоційованих білків, хоча й обмежується синтезом короткого праймера, комплементарного 3'-кінцевому виступу, є

критично необхідною для повноцінної реплікації хромосоми та не має прямих аналогів серед інших бактерій. [56, 58].

Функціональна організація генів у хромосомі - теломерні ділянки і центральна (core) частина. Геном представників роду *Streptomyces* відрізняється унікальною лінійною організацією, яка поєднує високу структурну консервативність центральної (core) області із вираженою варіабельністю теломерних ділянок. Така функціонально – архітектурна будова хромосоми здійснює одночасне збереження життєво важливих метаболічних процесів а також створює еволюційне підґрунтя для формування нових біосинтетичних можливостей та адаптивних ознак [39].

Центральна (core) частина хромосоми характеризується високим рівнем генетичної консервативності і стабільності. Вона містить гени, які кодують елементи систем транскрипції, трансляції і реплікації ферменти первинного метаболізму, рибосомні білки, а також гени, відповідальні за підтримання клітинної життєздатності та поділу. Збереженість цих послідовностей серед різних видів стептоміцетів свідчить про їхню вирішальну роль у забезпеченні базових фізіологічних функцій і енергетичного гомеостазу [39].

Теломерні ділянки хромосоми – це динамічні та генетично мінливі зони, які є головним джерелом еволюційних змін. Тут зібрані численні кластери генів біосинтезу вторинних метаболітів. До їхнього складу яких входять гени, які кодують непептидні синтетази (NRPS) полікетидні синтетази (PKS I–III), терпенові, сидерофорні, ектоїнові та інші шляхи. Теломерні ділянки вирізняються високою частотою подій рекомбінації, делецій, інсерцій, та горизонтального перенесення генів. Ці характеристики зумовлюють їхню роль у створенні нових метаболічних шляхів та біоактивних сполук природного походження [3].

Кодонний склад генів стрептоміцетів.

Для геномів представників роду *Streptomyces* є характерний один із найвищих серед прокариотів рівень ГЦ – пар, який у більшості видів коливається

у межах 22–75%, а у *Streptomyces albidoflavus* J1074 – типового представника роду сягає 73,3%. Високий рівень ГЦ – пар у ДНК впливає на кодонну структуру генів, і сприяє переважному використанню кодонів, багатих на гуанін та цитозин у третій позиції. Така особливість визначає типовий для стрептоміцетів «ГЦ – зсунений» профіль використання кодонів. «ГЦ – зсунений» профіль формує їхній унікальний молекулярний стиль трансляції а також адаптацію до геномної архітектури з високим вмістом GC-пар.

Особливо відомою ознакою кодонного складу генів у бактерій роду *Streptomyces* є наявність рідкісного лейцинового кодону ТТА, який трапляється вкрай нечасто — усього один або два рази на 70–200 кодованих послідовностей із загальної кількості 7–9 тисяч генів [27, 28]. У геномі *S. albidoflavus* J1074 виявлено 78 таких кодонів. Вони майже повністю відсутні у генах первинного метаболізму, проте часто зустрічаються у регуляторних та допоміжних генах, продукти яких беруть участь у синтезі вторинних метаболітів, морфогенезі, деградації складних полімерів та інших процесах адаптації [10].

Цікавим є те, що використання кодону ТТА тісно пов'язане із функціонуванням специфічної тРНК^{Leu}_UAA, яку кодує ген *bldA*. У *Streptomyces* цей кодон – тРНК – комплекс еволюціонував у регуляторний механізм, який є координатором морфологічної диференціації та біосинтезу антибіотиків. Синтез зрілої тРНК^{Leu}_UAA відбувається переважно на стаціонарній стадії росту, коли можна спостерігати пік продукції вторинних метаболітів. Це вказує на глибинний зв'язок між кодонним складом, рівнем експресії генів та життєвим циклом клітини [25].

Висока варіабельність у використанні рідкісних кодонів у межах регуляторних генів забезпечує додатковий рівень посттрансляційного контролю, що дозволяє клітині тонко координувати метаболічні шляхи у відповідь на зовнішні умови. Таким чином, особливості кодонного складу бактерій роду *Streptomyces* є не тільки відображенням їхньої ГЦ-багатої геномної структури, але і важливим елементом регуляції морфогенезу та вторинного метаболізму, що

сприяє їхній еволюційній пластичності а також здатності до біосинтезу широкого спектра біоактивних сполук [25].

1.5. Морфологічна і генетична нестабільність *Streptomyces*

Бактерії з роду *Streptomyces* — це одні із найскладніших за регуляцією життєвого циклу та будовою серед прокариотичних організмів. Вони мають розгалужений міцелій, спороутворення, складні сигнальні шляхи регуляції розвитку, а також наявність великих геномів з високим вмістом GC-пар [1].

Цей рід є своєрідним у значній морфологічній та генетичній варіативності. Це обумовлює його біотехнологічну цінність, проте створює труднощі в забезпеченні стабільного фенотипу, а саме у штамів, які використовуються в промисловості [1].

Морфологічна та генетична нестабільність *Streptomyces* має ендогенні та екзогенні причини. Нестабільність проявляється у зміні морфології колоній, варіабельності та здатності до споруляції, а також у змінній продукції вторинних метаболітів, включаючи антибіотики. Всі ці явища є відображенням складної взаємодії між умовами зовнішнього середовища, геномною організацією та епігенетичними механізмами.

Морфогенез у *Streptomyces* – це багатоступеневий процес, який включає утворення вегетативного субстратного міцелію, розвиток повітряного міцелію і подальше спороутворення. У лабораторних умовах часто можна спостерігати нестабільність цього процесу, саме у вигляді порушень формування повітряного міцелію або відсутності споруляції. Ці зміни можуть виникати спонтанно або бути наслідком тривалого субкультивування, трансформації клітин або мутагенезу [1].

Головними морфогенетичними регуляторами варто виділити гени *bld* (*bald*) та *whi* (*white*). Мутації в цих генах призводять до глибоких змін у розвитку колонії. Наприклад, мутації *bldA*, *bldB*, *bldC* є перешкодами які заважають переходу від вегетативного до повітряного росту, і це призводить до утворення

«голої» колонії без повітряного міцелію. Аналогічно, мутації які виникають в *whi* генах блокують споруляцію, хоча розвиток повітряного міцелію зберігається. Ключовим регулятором є транскрипційний фактор *AdpA*, контрольований системою *bld*. *AdpA* координує експресію великої кількості генів, відповідальних за спеціалізований метаболізм та морфогенез [13].

Також встановлено, що утворення повітряного міцелію є тісно пов'язаним з біосинтезом деяких вторинних метаболітів. Це є свідченням того, що інтеграція морфогенезу та метаболічної диференціації є глибокою. Тому зміни у морфології часто супроводжуються варіаціями продукції антибіотиків та інших метаболітів [1,16].

Ключовими регуляторами, мутації яких призводять до нестабільності, є *absB* (РНКазі III), *relA*, *afsR*, *afsS*, *adpA*. Наприклад, *absB* виконує роль регулятора деградації специфічних мРНК, і його мутація може спричинити надекспресію або недоекспресію важливих морфогенетичних а також метаболічних генів. *relA*, є відповідальним за синтез сигналу стресу. *(p)ppGpp*, опосередковує відповідь на обмеження поживних речовин та впливає на диференціацію. Ген *afsR* – це глобальний регулятор, який контролює деякі шляхи біосинтезу вторинних метаболітів. Порушення в його регуляції призводить до морфологічної та генетичної нестабільності [1,5].

Генетична нестабільність у *Streptomyces* – це наслідок особливостей будови їх геномів. Велика частина геному є представлена кластерними утвореннями, тобто групами генів, які відповідальні за біосинтез вторинних метаболітів. Вони часто залишаються транскрипційно неактивними за стандартних умов (так звані мовчазні кластери).

Генетична нестабільність проявляється у частій втраті плазмідних, та хромосомних маркерів, зокрема тих, що розташовані на кінцях хромосоми. Спочатку основною причиною цього явища вважали лінійну структуру геному та події рекомбінації, що спричиняють циркуляризацію геному та, відповідно,

делеції кінцевих генів. Було висунуто гіпотезу, що проблему можна вирішити, штучно перетворивши реплікон на кільцеву форму [11].

Проте, у наступних роботах було встановлено, що циркуляризація хромосоми *in vivo* за допомогою спрямованої рекомбінації навпаки сприяє посиленню генетичної нестабільності, викликаючи масові делеції термінальних послідовностей майже у 100 % випадків. Після другого раунду таких делецій хромосоми справді ставали більш стабільними, але втрачали значну частину генів [29, 46].

Рекомбінаційні події у теломерних зонах, де локалізується більшість біосинтетичних кластерів, є джерелом варіабельності в продукції вторинних метаболітів. Ці події можуть спричиняти як активацію нових біосинтетичних шляхів, так і втрату вже існуючих. Це часто спостерігається під час тривалого субкультивування [1, 43].

Наступні дослідження допомогли з'ясувати, що генетична нестабільність хромосоми стрептоміцетів є зумовлена не виключно гомологічною чи негомологічною рекомбінацією, а насамперед активністю мобільних генетичних елементів (МГЕ). Саме переміщення МГЕ зараз вважають головним механізмом хромосомної нестабільності. Генетичні перебудови можуть виникати внаслідок альтернативної транспозиції. Це коли транспозаза одночасно діє на комплементарні кінці різних копій МГЕ, що можуть розташовуватися як на одній, так і на різних хромосомах. Цей механізм не передбачає участі гомологічної рекомбінації. Це підтверджується відсутністю гомології між послідовностями, залученими до рекомбінації під час формування кільцевих хромосом стрептоміцетів.

Притому, кластеризація МГЕ у термінальних ділянках хромосоми створює сприятливі умови для явища альтернативної транспозиції, у якій беруть участь два або більше мобільних елементів одночасно [12].

Нестабільність *Streptomyces* — є складним багатофакторним явищем, яке поєднує морфологічні, генетичні, та екологічні чинники. Нестабільність

стрептоміцетів має велике значення для розуміння базових біологічних процесів, і біотехнології, де стабільність штамів – критично важлива. Глибоке знання регуляторних мереж, які є координаторами морфогенезу і спеціалізованого метаболізму, дозволяє ефективніше контролювати, досліджувати, та оптимізувати поведінку *Streptomyces* в лабораторних умовах і у промисловості [1, 41].

Втрата субтеломерних ділянок, формування кільцевих хромосом.

Субтеломерні ділянки хромосом стрептоміцетів характеризуються високою динамічністю та генетичною мінливістю, що робить їх одним з основних джерел геномної еволюції в межах роду *Streptomyces*. На відміну від центральної частини хромосоми, яка вирізняється стабільністю а також високим рівнем синтениї, субтеломерні області часто зазнають втрат, інверсій, інсерцій, та перебудов, які спричинені рекомбінаційними подіями або пошкодженнями ДНК. Головними механізмами, що зумовлюють втрату субтеломерних ділянок, є гомологічна рекомбінація і негомологічне з'єднання кінців, які активуються під час репарації дволанцюгових розривів. Унаслідок цього кінцеві ділянки хромосом можуть вкорочуватися, утворювати делеційні варіанти або навіть перетворюватися на циркуляційні структури [32].

Ці зміни ведуть до втрати специфічних генетичних модулів, які часто кодують ферменти вторинного метаболізму, регуляторні системи, транспортні білки, та фактори адаптації до стресових умов. Тому втрата субтеломерних ділянок, попри свою дестабілізуючу природу, має адаптивне значення: вона сприяє геномній пластичності, формуванню нових метаболічних фенотипів та розширенню екологічної ніші стрептоміцетів. Дослідження різних видів (*S. coelicolor*, *S. ambofaciens*, *S. lividans*) показали, що у межах одного виду можлива значна різниця в розмірах і складі субтеломерних зон. Це свідчить про їхню еволюційну «рухливість». Таким чином, втрата субтеломерних ділянок зумовлена не тільки нестабільністю геному, а й виконує важливу роль у процесах адаптаційної еволюції представників роду *Streptomyces* [32].

Хромосомна архітектура представників роду *Streptomyces* вирізняється значною структурною динамікою, що зумовлює їхню характерну геномну пластичність. Попри те, що хромосоми стрептоміцетів зазвичай мають лінійну організацію з термінальними інверсійними повторами (TIR), численні дослідження продемонстрували здатність цих репліконів до циркуляризації, тобто утворення кільцевих форм. Такі події, як правило, виникають внаслідок делецій обох теломерних ділянок або глибоких перебудов субтеломерних зон, які активують внутрішньомолекулярну або міжмолекулярну рекомбінацію [49].

Одним із найдетальніше описаних випадків циркуляризації є формування кільцевих хромосом у *S. griseus* 301-22-L та 301-22-M. Аналіз структур мутантів показав, що циркуляризація супроводжувалася утворенням великої паліндромної структури, яка охоплює обидва колишні кінці хромосоми. Такі структури раніше були відомі лише для лінійних плазмід *Streptomyces*, зокрема pSLA2, однак описані випадки демонструють, що подібні перебудови можливі також в хромосомах. Реплікація таких великих паліндромів не порушує життєздатності клітин. Це є свідченням унікальної особливості реплікаційного апарату цього роду. Детальний гібридизаційний аналіз підтвердив наявність у циркулярних хромосомах делетованих та ампліфікованих ділянок, що вказує на багатоступеневий характер процесу перебудови. Ймовірно, хромосомна делеція передуює циркуляризації, утворюючи проміжні форми з частковими втратами субтеломерних послідовностей, після чого негомологічне з'єднання кінців завершує утворення кільцевої молекули [49].

У представників роду *Streptomyces* виокремлено дві основні стратегії підтримання цілісності лінійних репліконів у разі пошкодження теломер. Перша передбачає рекомбінаційне відновлення теломерної ділянки за участю гомологічних послідовностей протилежного кінця хромосоми або лінійної плазміди. Друга полягає у циркуляризації хромосоми шляхом негомологічного з'єднання кінців після втрати обох теломерних структур. Крім того, у деяких мутантних штамів (*S. lividans*, *S. rimosus*) спостерігаються процеси ампліфікації

ДНК поблизу меж делецій, які можуть бути проміжною стадією перед формуванням стабільної кільцевої хромосоми. Сукупність цих механізмів демонструє високу геномну пластичність *Streptomyces* та їх здатність зберігати ефективну реплікацію навіть за умов значних хромосомних перебудов [49].

Штучна циркуляризація хромосом була також реалізована експериментально у *S. albidoflavus* J1074 під час мінімізації геному з метою створення оптимізованого гетерологічного господаря. У процесі послідовних делецій великих фрагментів поблизу теломерних ділянок (загалом близько 307 тис. пар нуклеотидів) отримано штам Del2 із кільцевою хромосомою. Незважаючи на значну втрату генетичного матеріалу, загальна морфологія колоній зазнала помітних змін. Це проявлялося у зниженні спороутворення майже у 100 разів. Такі результати свідчать, що циркуляризація хромосоми сумісна з життєздатністю клітин, однак може впливати на регуляцію розвитку і вторинного метаболізму.

Таким чином, формування кільцевих хромосом у *Streptomyces* може відбуватися природним шляхом унаслідок делецій і рекомбінаційних подій, або штучно за допомогою цілеспрямованих геномних модифікацій. Це явище демонструє високу структурну гнучкість геномів стрептоміцетів і має значне еволюційне та біотехнологічне значення, адже створення стабільних кільцевих форм відкриває перспективи для подальшої геномної оптимізації продуцентів природних сполук та моделювання еволюційних механізмів бактеріальних хромосом.

1.6. *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672

Streptomyces viridosporus ATCC 14672 – це представник роду *Streptomyces*, що входить до родини *Streptomycetaceae* порядку *Streptomycetales* класу *Actinobacteria*. Цей штам виділений з зразків ґрунту у процесі систематичних досліджень ґрунтової мікробіоти, які були проведені з метою виявлення мікроорганізмів-продуцентів біологічно активних сполук. Перші згадки про

ізоляцію *S. viridosporus* з'явилися у 1970-х роках, коли увагу дослідників привернули актиноміцети, які здатні продукувати нові типи ферментів та вторинних метаболітів [1].

Штам ATCC 14672 отриманий та депонований у міжнародній колекції Американського типового культурного центру (ATCC — American Type Culture Collection), що забезпечує стандартизацію і збереження референтних мікроорганізмів для наукових досліджень.

На момент відкриття *S. viridosporus* зацікавив дослідників в першу чергу завдяки своїй здатності продукувати унікальні біоактивні сполуки, а саме антибіотики, які стали об'єктом подальших глибоких біохімічних та генетичних досліджень [1]. Саме тому цей штам широко використовувався у подальших роботах з вивчення механізмів біосинтезу антибіотиків, таких як моеноміцин А.

Морфологічно штам є типовим для роду *Streptomyces* : формує міцеліальну структуру з чітким розділенням на вегетативний та повітряний міцелій. З віком культури з'являються характерні зеленуваті спори, які є результатом складних процесів морфологічної диференціації.

Відомості про геном *S. viridosporus* ATCC14672 : плазмід рSG5, рSG2.

Геном *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 належить до числа високоорганізованих і структурно складних геномів, характерних для представників роду *Streptomyces*. Він характеризується лінійною структурою хромосоми а також наявністю додаткових лінійних плазмід, що відіграють важливу роль у регуляції метаболічної активності, адаптації до навколишнього середовища та морфогенезі. Однією з таких плазмід є рSG5 — лінійна реплікативна молекула, що є основним компонентом генетичної організації цього штаму [34].

Плазміда рSG5 має лінійну будову з характерними кінцевими структурами — білково-зв'язаними теломерними послідовностями, які забезпечують стабільність і цілісність її реплікона. Реплікація рSG5 відбувається за механізмом, аналогічним до хромосомного, розпочинаючись у центральній *oriC*-

подібній ділянці та завершуючись утворенням комплементарних 3'-кінцевих виступів. Такі теломерні структури є типовими для плазмід стрептоміцетів та функціонують за участю білків Tap і Trg, що захищають кінці від деградації і сприяють їх відновленню після кожного циклу реплікації [34].

Плазміда pSG5 виконує не тільки роль автономного елементу реплікації, але й бере участь в регуляції вторинного метаболізму і диференціації клітини. У її складі виявлено численні відкриті рамки зчитування (ORF), зокрема гени, що пов'язані з мобільністю, експресією регуляторних білків, рекомбінацією, і потенційними шляхами біосинтезу малих метаболітів. За структурною організацією pSG5 належить до родини великих лінійних плазмід, які подібні до pSLA2-L, pSLA2-M або pSCL2, що характерні для багатьох видів *Streptomyces* та можуть виконувати функцію вторинних репліконів, підтримуючи взаємодію з хромосоною [34].

Функціонально pSG5 може впливати на транскрипційну активність генів хромосоми, а саме через наявність регуляторних елементів, що кодують сигнальні білки, транскрипційні фактори або ферменти з вуглеводною активністю (CAZymes). Подібні гени здатні модулювати клітинні процеси що пов'язані з деградацією складних полімерів, утворенням антибіотиків або біополімерів, що визначає екологічну конкурентоспроможність *S. viridosporus*. [34].

Особливістю pSG5 є її потенційна здатність до горизонтального перенесення, зумовлена наявністю транспозоноподібних та інтегративних елементів. Ця характеристика дозволяє плазміді забезпечувати внутрішньоклітинну стабільність і слугувати переносником адаптивних генів між близькоспорідненими штамми. Така мобільність сприяє еволюційному перерозподілу генетичних ресурсів та формуванню нових біосинтетичних можливостей у популяціях стрептоміцетів [34].

Отже, плазміда pSG5 у складі геному *S. viridosporus* ATCC 14672 є важливим елементом генетичної організації, що поєднує властивості мобільного

носія генетичної інформації та стабільного реплікону. Структурні та функціональні характеристики pSG5 свідчать про ключову роль у підтримці метаболічної пластичності, регуляції розвитку та забезпеченні еволюційної адаптивності цього виду [34].

Плазміда pSG2 – це ендогенна низькокопійна плазміда штаму *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672. Її розмір становить близько 13,8 кб, а вміст GC — 72,7%, що подібно до плазміди SCP2 з *S. coelicolor*. Кількість копій pSG2 становить до чотирьох на хромосому, а присутність певних сайтів рестрикції, зокрема EcoRI, BamHI, SstI, SphI і SalI [рис. 1.8] робить плазмідую зручною для подальших маніпуляцій у генно – інженерних дослідженнях.[55]

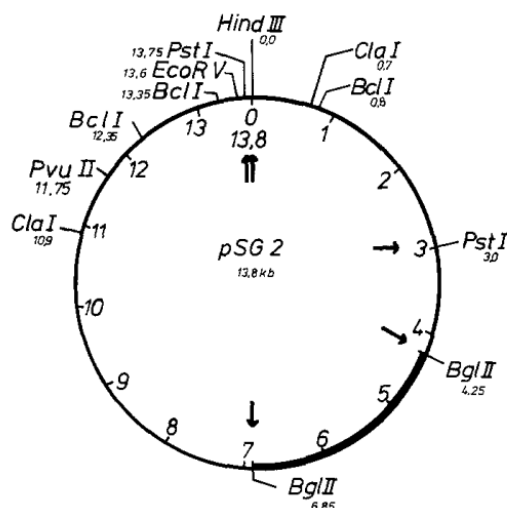


Рис. 1.8. Рестрикційна карта плазміди *Streptomyces viridosporus* pSG2 [55]

У процесі елімінавання pSG2 з клітин *S. viridosporus* не спостерігалось хромосомних перебудов, що свідчить про її автономність та стабільність. Проте втрата плазміди часто спричиняла порушення формування повітряного міцелію, але ця ознака не була безпосередньо зумовлена наявністю pSG2 [55].

На основі плазміди pSG2 були створені шаттл – вектори які здатні реплікуватися у *E. coli*, та в *Streptomyces*. Після злиття pSG2 із плазмідами *E. coli* (pBR325, pACYC184) було отримано серію гібридних конструкцій — зокрема

pSW1 і pSW154P2, які демонстрували здатність до реплікації в *S. lividans*. Плазмідна pSW1 виявилася автотрансмисивною, що підтверджувалось утворенням своєрідних «кишень», тобто зоною міжклітинного перенесення [55].

Подальша модифікація привела до створення плазмід pSW2, де із pSG2 було видалено непотрібний фрагмент BglII та вставлено ген стійкості до тіострептоні. Цей вектор ефективно трансформував різні штами *Streptomyces* — *S. viridochromogenes*, *S. viridosporus* та *S. griseus*, причому ефективність трансформації була подібною до pSW1 [55].

Таким чином, pSG2 – це багатонадійний реплікон низької копійності, який є основою для створення стабільних клонувальних векторів у бактерій роду *Streptomyces*. Завдяки своїй компактності, високому GC – вмісту а також сумісності з плазмідними *E. coli*, плазмідна pSG2 створює передумови для подальшого вдосконалення систем експресії та перенесення генів у промислово значущих штаммах актиноміцетів [55].

Біосинтетичний потенціал *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672

Однією із основних причин інтенсивного вивчення *S. viridosporus* є його здатність синтезувати важливі вторинні метаболіти, а саме антибіотики. Найбільш вивченим продуктом є моеноміцин А (MmA). Це унікальний антибіотик, який інгібує глікозилтрансферази – ключові ферменти синтезу пептидоглікану у бактерій [1]. Моеноміцин А є фосфогліколіпідом, який є дієвим в надзвичайно низьких наномолярних концентраціях та має притаманно широкий спектр активності. Унікальною особливістю MmA є те, що він не має на даний час відомих механізмів бактеріальної резистентності, на відміну від інших антибіотиків, таких як ванкоміцин. Ця особливість робить його перспективною мішенню для розробки нових антибактеріальних препаратів.

Крім моеноміцину ATCC14672 здатний продукувати низку унікальних метаболітів, серед яких особливу увагу привертають цинапептин, бафіломіцин та олікоміцин. Ці сполуки належать до різних класів вторинних метаболітів,

однак усі вони об'єднані складною модульною організацією біосинтетичних шляхів.

Цинапептин є представником групи нерибосомальних пептидів, відомий своєю антимікробною а також цитотоксичною активністю. Біосинтез цинапептину здійснюється за допомогою багатofункціонального ферментного комплексу NRPS (non-ribosomal peptide synthetase), який каталізує послідовне приєднання амінокислотних залишків у визначеній послідовності без участі рибосомного апарату. Цинапептин вирізняється наявністю гетероциклічних структур, що стабілізують молекулу і підвищують її біологічну активність. Наявність гена, гомологічного *cinA*, і допоміжних генів, що відповідальні за модифікацію бічних ланцюгів, свідчить про функціональність цього кластеру у *S. viridosporus*.

Бафіломіцин належить до макролактонних антибіотиків із класу полікететидів та продукується полікететидсинтазами I типу (PKS-I). Ця сполука є відомим інгібітором вакуолярної H^+ -АТФази. Завдяки цій характеристиці бафіломіцин демонструє виражену антипаразитарну, протипухлинну а також антибактеріальну дію. Кластер генів біосинтезу бафіломіцину у *S. viridosporus* включає типові модулі PKS, що містять домени кетосинтази, ацилтрансферази та ацил – носійного білка (ACP), які послідовно формують полікететидний ланцюг. Біосинтетичні особливості цього кластеру вказують на тісну еволюційну спорідненість з відомими продуцентами бафіломіцину, такими як *Streptomyces griseus* та *Streptomyces lohii*.

Олікоміцин є макролідним антибіотиком, який утворюється за допомогою полікететидсинтази I типу і належить до групи комплексних макролактонів з вираженою антибіотичною активністю. Кластер генів синтезу олікоміцину у *S. viridosporus* включає типовий набір модульних PKS-генів, що кодують ферменти для послідовного подовження ацильного ланцюга, і гени, що беруть участь у метилюванні, гідроксилюванні та естерифікації макролактона.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріали

2.1 Штами бактерій, використані у роботі

Усі бактерійні штами перераховані у Таблиці 2.1. Нуклеотидні послідовності геномів стрептоміцетів, що використали у дослідженні, доступні на веб-сайті NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome).

Таблиця 2.1

Штами бактерій використані у роботі

Штам/плазміда	Характеристика	Опис
<i>S. viridosporus</i> (= <i>ghanaesis</i>) ATCC14672	Продуцент моеноміцинів дикого типу	Американська колекція типових культур, ATCC; Макітринський 2012
<i>S. viridosporus</i> N1	Спонтанний варіант дикого типу, морфологічно відрізняється від №3 тим, що формує зморшкуваті колонії з щільним сірувато-зеленим повітряним міцелієм та помірним субстратним міцелієм, що свідчить про активне спороутворення.	Ця робота
<i>S. viridosporus</i> N3	Спонтанний варіант дикого типу, морфологічно найближчий до референтного штаму з колекції ATCC (дикий тип)	Ця робота

<i>S. viridosporus</i> N4	Спонтанний варіант дикого типу, морфологічно відрізняється від №3 слабшою споруляцією та більш тьмяним сірим забарвленням колоній, що свідчить про можливі зміни у пігментації та регуляції спороутворення.	Ця робота
<i>S. viridosporus</i> N7	Спонтанний варіант дикого типу, порушення формування повітряного міцелію та спор на твердих середовищах	Ця робота
<i>Bacillus cereus</i> ATCC19637	Тест-культура для виявлення протибактерійної активності	ATCC

2.2. Реактиви

Для приготування середовищ використали: казамінові кислоти, пептон, триптон, дріжджовий та LabLemco екстракти, агар фірми „Difco” (США); гліцин, манітол („Sigma”, США), D-глюкозу та D-мальтозу фірми Mallincrodt (США), соєвий пептон „Merck”, надчисту агарозу MLW (BioZym, Німеччина). У роботі використано антибіотики: канаміцину сульфат, апраміцину сульфат, спектиноміцину сульфат, („Sigma”, США, „Roth”, ФРН). Робочі концентрації антибіотиків (мкг/мл) у поживних середовищах для селекції клітин кишкової палички були такі (в дужках вказано концентрації для стрептоміцетів): карбеніциліну – 100; канаміцину – 25 (50); апраміцину – 25 (50). У дослідженні використали інші реактиви стандартних виробників: діамінопімелінову кислоту (Sigma, США), хлорид-, фосфат- та гідрофосфат К і Na, хлорид і сульфат Mg, NaNO₃, бромфеноловий синій, сахарозу, льодяну оцтову, сірчану, малеїнову кислоти, хлороформ, метанол, етилацетат. Усі останньо згадані органічні розчинники мали клас чистоти purissimo (Roth GmbH, Німеччина).

Методи

2.3. Умови культивування *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672

У роботі використовували такі середовища: вівсяний агар (ОА), ISP №2 (International *Streptomyces* Project medium 2), триптон-соєвий агар (TSA), GYM (Glucose Yeast extract Malt extract), триптон-соєвий бульйон (TSB, Санімед, Харків), та STSBA (триптон – 10 г/л, хлорид натрію – 5 г/л, агар – 20 г/л). Склад усіх середовищ (крім зазначених тут у тексті) див. Koshla et al. (2017). Кожне з цих середовищ створює різні умови для росту та диференціації колоній. Вівсяний агар (ОА) показав найвищу вираженість морфологічної варіабельності. Структура поверхні колоній і їх забарвлення були чітко диференційовані. ОА складався із вівсяної крупи, автоклавованої у дистильованій воді, та агар-агару, що забезпечував стабільну текстуру. ISP №2 стандартне середовище для первинної діагностики стрептоміцетів. Його склад включав дріжджовий екстракт, мальтозу і агар. Це середовище підтримувало розвиток типових для роду *Streptomyces* форм колоній. TSA забезпечувало хороший ріст, проте не сприяло чіткій диференціації морфотипів. Використовувалося переважно для порівняння інтенсивності росту. Середовище GYM стимулювало активний розвиток повітряного міцелію та демонструвало помірну варіабельність колоній. До його складу входили глюкоза, дріжджовий екстракт, солод та агар. TSB – це рідке універсальне поживне середовище, що забезпечує інтенсивний ріст *Streptomyces*, його використовували для того, щоб отримати достатню кількість біомаси для отримання моеноміцину. До складу TSB входить триптичний гідролізат казеїну, соєвий пептон, хлорид натрію, фосфатні солі та глюкоза. STSBA – це спеціалізоване селективне середовище, яке використовували для подальшого клонування та оцінки стабільності фенотипів. Середовище включало триптон, соєве борошно, крохмаль та агар. Воно забезпечувало виразну фенотипову стабільність колоній.

Середовища готували відповідно до класичних методик стерильного культивування. Особлива увага приділялася однорідності агару при твердінні та запобіганню осадженню компонентів. Результати культивування документували за допомогою цифрової фотографії та протоколів досліджень. Морфологічні особливості колоній описували за стандартними показниками: форма, розмір, пігментація, наявність повітряного міцелію, здатність до споруляції.

2.4. Підготовка інокуляту та варіанти посіву культур

Інокулят отримували з колоній, вирощених протягом 7 діб на вівсяному агарі за температури 30°C, за стерильних умов. Колонії з характерними морфологічними ознаками (інтенсивне спорування, добре розвинений повітряний міцелій) обиралися для подальшого використання як джерело спорової суспензії.

Для отримання інокуляту з однієї колонії використовували стерильну бактеріологічну петлю або скребок, яким зішкрібали частину повітряного міцелію разом із спорами. Зібраний біоматеріал ресуспендували у 1 мл дистильованої води. Суспензію ретельно перемішували на вортексі протягом 2–3 хвилин для забезпечення рівномірного розподілу спор, або ж ресуспендували суміш за допомогою дозатора. Одержану суспензію використовували одразу для посівів. Інший варіант засіву включав вирізання колонії з агару та поміщення її у рідке середовище.

Для отримання потрібної концентрації бактерій *Streptomyces viridosporus* виконували серійні десятикратні розведення. У 6 мікропробірок додавали по 900 мікролітрів дистильованої води. У чашку Петрі з попередньо вирощеним газоном *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 додавали трохи води, після чого суспензували за допомогою мікробіологічної петлі. Отриманий інокулят набирали у дозатор (100 мікролітрів) і проводили серійне десятикратне розведення. Після чого у 3 чашки Петрі висівали розведення 10^{-5} , і ще у 3 - 10^{-6} . Чашки Петрі залишили у термостаті при температурі 30 градусів.

У дослідженні використовували кілька методів посіву мікроорганізмів, зокрема такі методи як суцільний посів (газоном) та посів методом збідненого штриху.

Суцільний посів застосовувався у дослідженні *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 як ключовий метод для оцінки антибіотичної активності штаму, а також для візуального аналізу пігментації та морфології колоніального шару. Метод дозволяє отримати щільне й рівномірне бактеріальне покриття по всій поверхні агаризованого поживного середовища, створюючи умови максимальної біомаси в межах площі чашки Петрі.

Для цього використовували 100 мкл бактеріальної суспензії, яку попередньо готували шляхом серійного розведення стокової культури у стерильній дистильованій воді. Отриманий інокулят вносили на центр попередньо підготовленої чашки Петрі або планшетки з уже застиглим середовищем. Розподіл суспензії по поверхні здійснювали стерильним шпателем Дригальського, обережно обертаючи чашку чи планшетку для досягнення рівномірного покриття. Слідкували за тим, щоб не пошкодити поверхню агарового шару. Використання планшетки для посіву культури *Streptomyces* було зумовлене необхідністю великої кількості агарових блоків, які можна було отримати після вирощування.

Посів методом збідненого штриху застосовувався для ізоляції окремих колоній з популяції *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672, що вироста після попереднього культивування. У ході дослідження для виконання цього методу використовували стерильні зубні палички, якими здійснювали нанесення зразка на поверхню агаризованого середовища у вигляді послідовних штрихів. Матеріал для посіву відбирали з центру зрілої колонії, оскільки ця ділянка є найбільш морфологічно сформованою. Штрихи наносили плавними рухами, не проникаючи вглиб середовища. Таким чином створювалися зони з різною концентрацією клітин мікроорганізмів, що дозволяло окремим клітинам або спорам формувати ізольовані колонії. Чашки Петрі з нанесеними штрихами

інкубували у термостаті при температурі 30 або 35 °С. Згодом окремі колонії використовували для подальшого клонування, морфологічного аналізу або біотестування.

2.5. Морфологічний та фізіологічний аналіз колоній

Використовували візуальну оцінку колоній, дослідження росту за різних температур, а також мікроскопування відібраних колоній.

Форма, колір і здатність до споруляції оцінювались візуально на різних етапах росту, а також фіксувалися у вигляді фотографування та записів у протоколах досліджень. Візуальна оцінка включала аналіз макроскопічної морфології колоній на різних поживних середовищах.

Для аналізу впливу температури на ріст та розвиток *S. viridosporus* ATCC 14672 здійснено посів методом штриха семи клонів на ОА. Всього було підготовлено 14 чашок Петрі: по 7 на кожну з температур (30°C і 35°C). Матеріал для посіву відбирали стерильними зубними паличками з центру колонії. Посів проводився шляхом нанесення штриха. Після посіву чашки Петрі поміщали у термостат на відповідну температуру. Клони, що демонстрували нетипові морфологічні характеристики, виявляли візуально та мікроскопічно (стереобінокуляр ELW, 20-200 кратне збільшення). Мікроскопування колоній здійснювали щодня, з 5-го по 10-й день росту.

2.6. Клонування колоній

У межах дослідження мінливості та стабільності фенотипових ознак штаму *Streptomyces viridosporus* ATCC14672, особливу увагу було приділено клонуванню окремих колоній із попередніх посівів, що вирізнялися характерними морфологічними особливостями.

Перший етап включав вибір колоній із посіву, закладеного ще під час виконання курсової роботи, 23.10.24. Після розведення зразків, інокульованих на мінімальне та вівсяне середовище, спостерігали зростання колоній з різною

морфологією. Було зафіксовано появу колоній з темно-зеленим, сизим і білим забарвленням. З урахуванням їх морфологічної відмінності, із чашок, засіяних на вівсяному агарі, було обрано п'ять колоній для подальшого пересіву. Зазначимо, що вівсяне середовище сприяло більшому різноманіттю фенотипів, що узгоджується з літературними даними щодо впливу компонентів середовища на морфогенез *Streptomyces*. [1].

Колонії для клонування відбиралися стерильними зубними паличками, якими здійснювався точковий забір матеріалу з центральної частини колонії. Центр колонії характеризується найбільшою зрілістю та стабільністю морфологічних ознак. Матеріал наносився на свіжоприготоване середовище ОА з висівками шляхом плавного нанесення. Усього було закладено три чашки Петрі: у першу висіяно три колонії (біла, сіра, зелена), у другу — одну колонію (світло-сіра), у третю — ще одну світло-сіру колонію.

Після інокуляції чашки інкубувалися у термостаті при температурі 30 °С протягом 5–7 днів. Контроль стабільності фенотипів здійснювався візуально, з використанням цифрової фотографії та записів у протоколи досліджень. Особливу увагу звертали на зміну кольору, структури поверхні колоній, утворення спор та міцелію.

19.11.24 було проведено повторне клонування. Посів відбувався методом штриху. Обрано сім клонів, включаючи ті, які були відібрані 05.11.24. Для кожного клону було підготовлено по дві чашки: одну інкубовано при 30 °С, іншу — при 35 °С. Метою було визначити вплив підвищеної температури на морфогенез та можливу нестабільність фенотипу. За результатами інкубації з семи клонів було обрано чотири (1, 3, 4, 7), що мали нетипові морфологічні ознаки (інтенсивне спороношення, зміни у забарвленні) для подальшого пересіву. 26.11.24 здійснено повторний посів клонів 1, 3, 4, 7 на середовище з висівками для перевірки стабільності морфологічних ознак. Далі пересіви і перевірка стабільності тривали під час літньої практики та виконання кваліфікаційної роботи (6 разів).

2.7. Дослідження утворення морфологічно відмінних ліній *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672

Для визначення кількісних показників утворення морфологічно відмінних ліній штаму *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 було застосовано метод серійних (десятикратних) розведень вихідної суспензії мікроорганізмів. Отримані розведення використовували для посіву на агаризоване середовище з висівками.

На першому етапі досліду посів проводили зразками шостого та сьомого розведень. Проте аналіз результатів первинного посіву показав, що використані розведення (10^{-6} та 10^{-7}) виявилися надто бідними для кількісного підрахунку колоній, оскільки на чашках формувалася недостатня кількість колоній для статистично достовірного аналізу.

З метою оптимізації умов проведення досліду було підготовлено новий інкулянт із четвертим та п'ятим розведення вихідної культури. На кожну чашку Петрі наносили по 50 мкл суспензії. Загалом було висіяно 16 чашок: тринадцять із четвертим розведенням і три з п'ятим. Усі чашки інкубувалися в термостаті при температурі 30 °C. На 13 – й день інкубації для підрахунку кількості морфологічно відмінних колоній було обрано 5 чашок. Отримані дані використовували для оцінки частоти утворення фенотипово різних ліній та подальшого аналізу морфологічної мінливості штаму *S. viridosporus* ATCC 14672.

2.8. Методи тестування антибіотичної активності *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672

Для оцінки антибіотичної активності клонів *Streptomyces viridosporus* ATCC14672, що були отримані шляхом клонування колоній з характерними морфологічними ознаками, проведено біотестування з використанням методики агарових блоків та диско-дифузійного методу.

Біотестування антибіотичної активності методом агарових блоків виконували на середовищі TSA. На попередньо залиті чашки Петрі з середовищем TSA сіють бактерію. Після закінчення росту із середовища вирізають концентричні блоку носиком для дозатора [рис. 2.1].

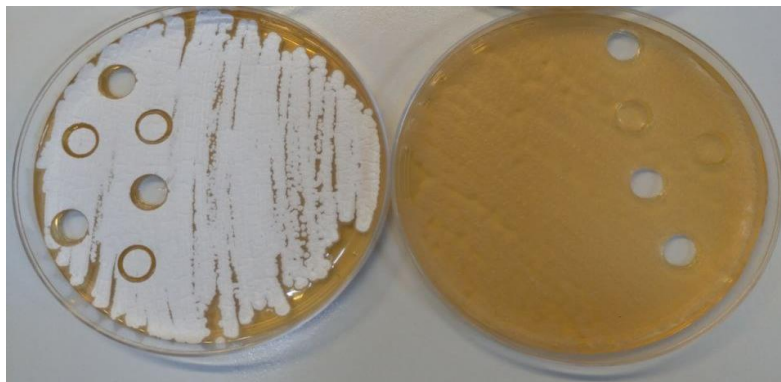


Рис. 2.1. Процес отримання агарових блоків на визначення суммарної антибіотичної активності *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672

Далі блоки ставлять на чашку зі свіжозасіяною тест-культурою, *B. cereus* ATCC14672. Спосіб розкладання блоків зображений внизу [рис.2.2].

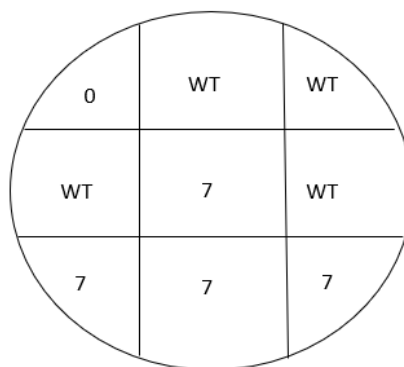


Рис. 2.2. Приклад нанесення блоків на чашку Петрі

Відбирають вирізану культуру стерильними зубними паличками. Після завершення роботи чашки розміщували у термостаті за температури 30 градусів Цельсія на 1 добу. Для виявлення сильнішої чи слабшої антибіотичної активності вимірювали діаметр кільця яке утворилося довкола тест - культури. Чим більше кільце - тим більша антибіотична активність. Результати фотографувались і

вносились у протокол досліджень. Також використовувався альтернативний варіант отримання агарових блоків. Для цього використовувалась стерильна планшетка, у яку наливали розігріте середовище TSA. Після застигання стерильним скальпелем зрізався верхній шар середовища який був поза межами лунки. Бактерії роду *Streptomyces* наносили методом суцільного посіву газоном. Після вирощування можна було отримати багато агарових блоків які відділялися стерильною зубною паличкою або скальпелем від стінок лунки.

Для виявлення антибіотичної активності застосовували тест-організми, чутливі до антибіотиків, які продукує *Streptomyces viridosporus*. Вибір конкретного організму залежав від цілей досліду та спектру активності досліджуваного штаму. Як правило, використовували штами грампозитивних бактерій, що відомі своєю чутливістю до глікопептидних та фосфогліколіпідних антибіотиків, зокрема до моеноміцинів. У випадках, коли це було необхідно, тест-організми вирощували на окремих середовищах, після чого вносили у м'який агар для формування другого шару.

Для визначення стійкості до антибіотиків використовувався диско-дифузійний тест. Цей метод оснований на здатності антибіотиків дифундувати з просочених ними паперових дисків в поживне середовище і пригнічувати ріст мікроорганізмів посіяних на поверхні агару. Стерильні паперові диски, просочені антибіотиками, розміщували на поверхні TSA, попередньо засіяної тест-організмом *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672. Антибіотики, що використовувались: цефтазидим, цефепім, ампіцилін, новобіоцин, ванкоміци, еритроміцин, канаміцин, тетрациклін, поліміксин, рифампіцин, мономіцин, ципрофлоксацин, тіострептон. Кожен антибіотик спрямований на різні клітинні мішені: синтез клітинної стінки (ампіцилін, ванкоміцин, цифепім, цефтазидим), синтез білка (еритроміцин/олеандоміцин, тетрациклін, канаміцин), синтез ДНК або РНК (новобіоцин, рифампіцин, ципрофлоксацин). Після інкубації протягом 24 годин при температурі 30 °C аналізували утворення зон інгібування навколо дисків. Цей метод також використовувати для порівняння антибіотичної

активності екстрактів різних штамів-продуцентів моеноміцинів. Він дає змогу порівняти відносну антибіотичну активність між різними ізолятами або клонами та використовується як швидкий скринінговий інструмент у мікробіологічних дослідженнях [1].

2.9. Методика отримання моеноміцину з штаму №7 та WT

Для оцінення здатності мутантного штаму №7 продукувати моеноміцин порівняно з культурою дикого типу, було виконано низку експериментів, спрямованих на вирощування біомаси, відділення культуральних фракцій і подальшу екстракцію сполуки з наступним аналітичним підтвердженням її наявності методом тонкошарової хроматографії.

З чашок Петрі, на яких культивували штам №7 або дикий тип вирізався фрагмент агаризованого середовища (1×1 см) який розміщувався у дві стерильні скляні колби, до кожної з яких додавали по 40 мл поживного рідкого середовища TSB. Після цього їх розміщували на шейкері за температури 30 °C протягом п'яти діб.

Для перевірки контамінації рідких культур здійснювали їх пересів на середовище TSA. Із кожної колби відбирали по 100 мкл рідини та висівали на окремі чашки. Після інкубації за температури 30 °C отримання однорідних колоній підтверджувало відсутність контамінації та можливість використання культур для екстрагування антибіотиків.

Для того, щоб відділити супернатант від біомаси рідкі культури переносили зі скляних колб у стерильні пластикові ємності об'ємом по 35 мл. Після цього зразки центрифугували протягом 15 хв.

Для очищення моеноміцину з культуральної рідини використовували C18-колонки (50 мг), які попередньо активували послідовним промиванням 1 мл метанолу та 1 мл дистильованої води. Моеноміцин адсорбувався на твердому носії, після чого проводили його елювання.

Через колонки пропускали по 5 мл супернатанту, потім здійснювали промивання 1 мл води та 1 мл метанолу. Отриманий метанольний елюат збирали

в епендорфи — саме ця фракція використовувалася для подальшого аналізу методом тонкошарової хроматографії.

До біомаси штаму №7 та wt безпосередньо у колбі додавали метанол у співвідношенні 1:1, перемішуючи скляною паличкою або дозатором до утворення однорідної суспензії. Отриману суміш центрифугували протягом 1 хв, після чого відділяли рідку фазу від залишку біомаси. Елюат з біомаси та супернатанту частково осушували у вакуумному концентраторі до підвищення концентрації речовини.

Також проводили тонкошарову хроматографію з метою підтвердження наявності моеноміцину в отриманих екстрактах. Метод ґрунтувався на різній сорбційній здатності компонентів суміші під час руху по нерухомій фазі — тонкому шарі сорбенту на алюмінієвому носії. Як рухому фазу використовували водний розчин аміаку. У скляну хроматографічну баню наливали 2–3 мм розчину аміаку. Кришку бані герметизували вазеліном для запобігання випаровуванню розчинника. На алюмінієвий лист для ТШХ наносили по 3 мкл таких зразків: дикий тип, супернатант №7, екстракт із біомаси №7. Кожне нанесення повторювали тричі з проміжним висушуванням у термостаті протягом 3 хв.

Після підняття розчинника до верхнього краю листа його виймали з бані, висушували 5–10 хв при 30 °С і вирізали за розміром чашки Петрі. Пластинку розміщували поверх свіжоприготованого середовища TSA у чашці, після чого покривали тонким шаром м'якого агару із культурою бактерій *Bacillus subtilis*. Інкубацію проводили при 30 °С протягом 24 год.

2.10. Дослідження обміну метаболітами

З метою дослідження процесів споруляції та можливого обміну метаболітами між різними клонами *Streptomyces* було закладено серію тестів за участі 7 клону (умовно лисий фенотип) та 3 клону (дикий тип). Основною метою дослідження було встановлення, чи спроможні ці два клони здійснювати метаболічну взаємодію при спільному культивуванні на твердому поживному

середовищі, а також виявлення просторових умов, необхідних для ефективного обміну метаболітами між ними.

Для реалізації експерименту було підготовлено шість чашок Петрі з поживним середовищем: чотири з них містили GYM-агар, ще дві – вівсяне агаризоване середовище. Вибір цих середовищ був зумовлений необхідністю забезпечення оптимальних умов для росту *Streptomyces* та прояву специфічних фенотипових ознак, пов'язаних із продукцією вторинних метаболітів та споруляцією.

Безпосередньо перед інокуляцією на поверхню середовища здійснювався відбір біомаси зі штамів 7 та 3, які попередньо були вирощені на окремих чашках Петрі. Відбір здійснювався за допомогою стерильної мікробіологічної петлі. Біомасу наносили на свіжі чашки з агаризованим середовищем у формі компактних квадратів розміром приблизно 1×1 см. Розміщення зразків на чашці було симетричним: з правого боку наносили біомасу 3 клону (дикого типу), а з лівого — біомасу 7 клону (лисого).

Ключовим аспектом методики було варіювання відстані між колоніями двох клонів на одній чашці. У верхній частині кожної чашки відстань між клонами становила приблизно 1 см. Ця ділянка виконувала функцію негативного контролю, оскільки передбачалося, що така дистанція є надто великою для ефективного обміну метаболітами через дифузію. У нижній частині тієї ж чашки відстань між 3 і 7 клонами становила 5–7 мм, що, згідно з попередніми припущеннями, мало забезпечити умови для потенційної метаболічної взаємодії.

2.11. Виділення ДНК та підготовка до секвенування

Одним із ключових етапів у дослідженні генетичних особливостей штаму *Streptomyces viridosporus* ATCC14672 є виділення геномної ДНК високої якості.

Геном цього штаму був повністю секвенований, а серед його генів виокремлені кластери, що відповідають за синтез фосфогліколіпідних антибіотиків, зокрема моеноміцину А. Цей кластер, поділений на *моe-1* та *моe-*

2, позбавлений специфічних генів-регуляторів та особливих генів, що забезпечують стійкість штаму до власного антибіотику. Така організація свідчить про метаболічну ощадливість: для біосинтезу кінцевої молекули використовуються переважно попередники з первинного метаболізму. [1]

Необхідність цього дослідження полягала у тому, щоб виділити і просеквенувати клони ATCC14672. Особливо штам №7, який виявляв більшу антибіотичну активність.

Для того, щоб виділити ДНК з ATCC14672 клони необхідно пересіяти в колби, і вирощувати у рідкому середовищі для того, щоб наростити біомасу.

Виділення геномної ДНК здійснювали методом висолювання з дотриманням ряду етапів. Осаджені клітини ресуспендували у буфері і доводили до однорідної маси. Далі суміш інкубували у термостаті при температурі 35 °C до утворення желеподібної консистенції, що свідчить про набухання клітинного матеріалу та підготовку до ферментативного лізису. До отриманої суміші додавали протеїназу з метою деградації білків. Для покращення її дії додатково вносили детергент, який забезпечував денатурацію білків і полегшував доступ ферменту до клітинного вмісту. Пробірки з реагентами поміщали у водяну баню при температурі 50 °C на 2 години — це оптимальний режим для активності використовуваної протеїнази. Після ферментативного лізису виділену ДНК переносили у розчин за допомогою піпетки Пастера, обережно намотуючи нитку ДНК на кінчик інструмента. Далі її частково підсушували у сушильній шафі або на відкритому повітрі. Отримані зразки зберігали в холодильнику у розчині дистильованої води до подальшого використання.

Оцінка якості та цілісності виділеної ДНК здійснювалася шляхом гелелектрофорезу. Спочатку готували 1% агарозний гель у TE-буфері з додаванням бромід етидію для флуоресцентної візуалізації. У подальшому, за рекомендацією секвенувальної лабораторії, концентрацію агарози зменшували до 0,7%, що дозволяло покращити міграцію великих фрагментів ДНК через пори гелю. Попередньо зразки розігрівали у кюветах до температури 55 °C у спеціальному

термостаті. Така процедура сприяла переходу ДНК з піпетки Пастера у бідистильовану воду завдяки набуханню при нагріванні. Після цього проводили серію десятикратних розведень: у чотири пробірки вносили по 180 мкл дистильованої води, після чого до них додавали по 20 мкл зразка ДНК. Перед кожним перенесенням суміш ресуспендували дозатором для забезпечення рівномірності набору молекул ДНК які потрапили в дозатор. Для електрофоретичного аналізу використовували маркери Tryptek з трьома пігментами, що дозволяло точно визначити молекулярну масу досліджуваних фрагментів. У вісім пробірок додавали по 2 мкл барвника та по 10 мкл розведеної (1/10) або нерозведеної ДНК. Розчини завантажували у лунки гелю (по 5 мкл суміші кожна), використовуючи зразки з чотирьох проб нерозведених і чотирьох проб розведених 1/10 (відповідно до клонів 1, 3, 4, 7). Електрофорез проводили при напрузі 90–100 В протягом 45–60 хвилин. Візуалізацію ДНК здійснювали за допомогою УФ-детекції. Додатково чистоту зразків оцінювали спектрофотометрично шляхом вимірювання оптичної щільності при довжинах хвиль 260 нм та 280 нм, що відповідають максимумам поглинання нуклеїнових кислот і білків відповідно. Співвідношення A260/A280 дозволяє оцінити ступінь забруднення зразка білками або іншими органічними сполуками. Значення у межах 1.8–2.0 вважається оптимальним для чистої ДНК та свідчить про її придатність до подальших молекулярно-біологічних досліджень, зокрема секвенування. Значення нижче 1.8 вказують на наявність домішок білкової природи.

2.12. Біоінформатичний аналіз результатів секвенування геномів морфологічно відмінних ліній штаму ATCC 14672

Після успішного отримання високомолекулярної ДНК клонів № 1, 3 та 7 та дикого типу її передали до лабораторії проф. Й. Каліновскі (ун-т Білефельда), яка просеквенувала зразки методом ONT (Oxford Nanopore Technologies). Цей метод ґрунтується на пропусканні окремих молекул ДНК або РНК через білкові

нанопори. Коли нуклеотид проходить через нанопору, він тимчасово блокує або змінює струм іонів, що протікають через неї, і ця зміна реєструється для визначення типу нуклеотиду. Ця технологія забезпечує отримання довгих рідів, що полегшує складання геномів і виявлення структурних варіацій.

Для біоінформатичного аналізу результатів секвенування використовувалась відкрита веб – платформа Galaxy (<https://usegalaxy.org/>), яка дає змогу виконувати обробку, візуалізацію та інтеграцію геномних даних завдяки великій кількості біоінформатичних інструментів.

Щоб оцінити вихідні дані із Fasta файлів з нуклеотидними посліовностями використовувався інструмент FastQC (usegalaxy.org/fastqc-0.74+galaxy1).

Цей інструмент допомагає оцінити якість рідів – коротких послідовностей нуклеотидів які були отримані під час секвенування ДНК, перевіряє можливі технічні артефакти, аналізує GC-вміст, виявляє адаптерні послідовності та оцінює рівень дуплікацій. Такий аналіз дає змогу визначити необхідність додаткової обробки даних, а також дозволяє вчасно виявити потенційні забруднення чи зниження якості секвенування.

Ще одним інструментом який використовувався був Flye (usegalaxy.org/flye-2.9.6+galaxy0) – асемблер для складання геномної послідовності у середовищі Galaxy. Він призначений для побудови геномів на основі довгих рідів з Oxford Nanopore, що забезпечує формування контигів. Flye також виконує корекцію помилок сирих рідів, що підвищує точність отриманої збірки та робить його оптимальним інструментом для реконструкції повногеномних послідовностей.

Prokka (usegalaxy.org/prokka-1.14.6+galaxy1) у середовищі Galaxy використовували для автоматичної анотації прокаріотичного геному та пошуку цільових генів, які могли вплинути на морфологічні та фізіологічні характеристики клону №7. Інструмент приймає зібрану послідовність, отриману за допомогою Flye, і забезпечує ідентифікацію та функціональне позначення генів (CDS), їхніх білкових продуктів, структурних РНК, а також визначає

функціональні домени й можливі назви генів на основі відповідних баз даних, таких як UniProt та RefSeq.

Для порівняння геномних послідовностей у роботі застосовували інструмент D-GENIES ([d-genies](#)), який забезпечує побудову інтерактивних dot – plot графіків для візуалізації подібності та відмінностей між двома геномами. Він працює за принципом вирівнювання послідовностей референтного та досліджуваного геному, після чого перетворює отримані результати вирівнювання у точкову діаграму, що відображає ступінь їхньої подібності та можливі структурні перебудови. Цей інструмент дозволяє оцінити рівень відповідності між геномами, виявити інверсії, делеції чи дуплікації, а також перевірити якість отриманої збірки шляхом порівняння її з еталонною послідовністю.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Виявлення природної морфологічної мінливості колоній *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672

Здійснене культивування цього штаму на двох типах твердих поживних середовищ: TSA та вівсяному агарі [рис. 3.1].

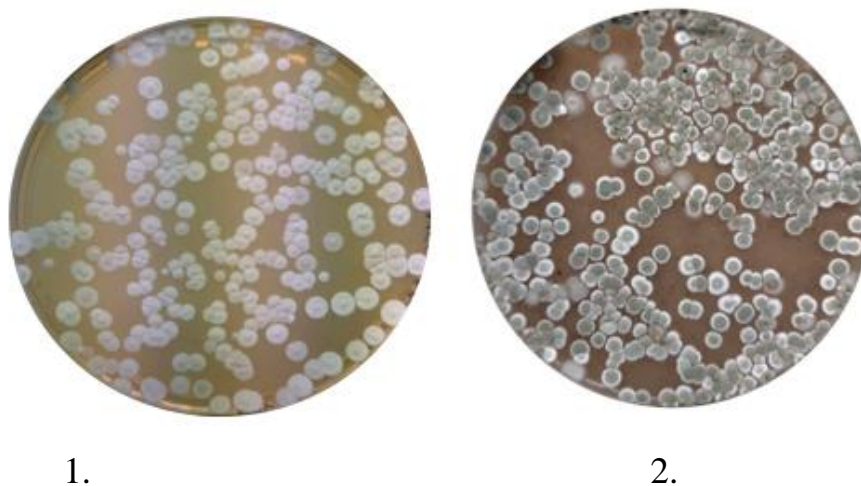


Рис. 3.1. Результати культивування *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672. 1 – TSA, 2 – вівсяний агар. 5 діб росту

Колонії, які були вирощені на TSA проявляли низьку морфологічну мінливість. Колонії були фактично однаковими за розміром, мали чіткі межі та однорідно біле забарвлення без ознак пігментації чи споруляції.

На вівсяному агарі спостерігали більшу морфологічну мінливість колоній. Зокрема, колонії характеризувалися різноманітністю за розміром, наявністю зонального росту та добре вираженою структурною диференціацією. Колонії утворюють спори, є колонії з темно – зеленим, сизим, та білим забарвленням. Поверхня колоній була зернистою або зморшкуватою, що свідчить про активне формування спороносних структур [рис. 3.2].

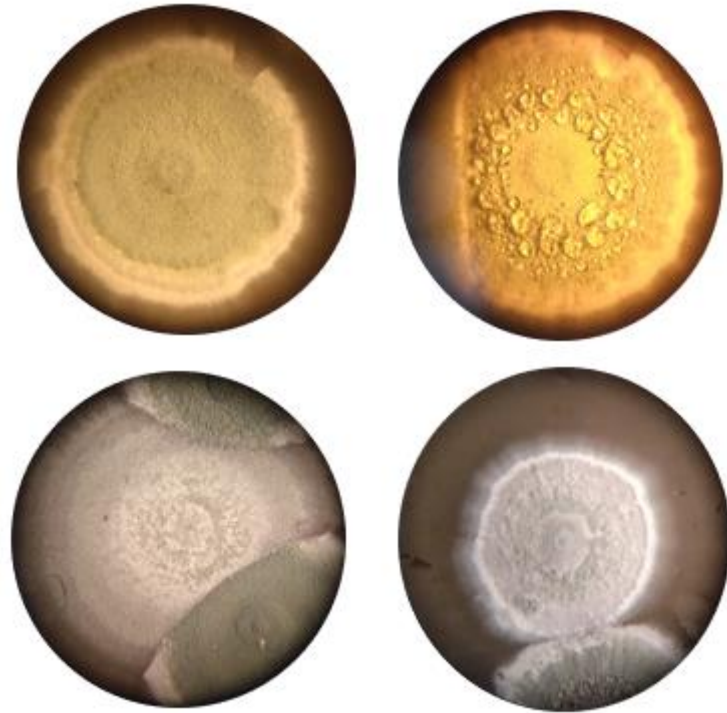


Рис. 3.2. Морфологічна різноманітність колоній *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 під мікроскопом, 40×. Середовище ОМ, 8 діб росту

Також ці дані підтвердили результатами електронної сканувальної мікроскопії [рис. 3.3]. Видно, що різні колонії мають морфологічні відмінності.

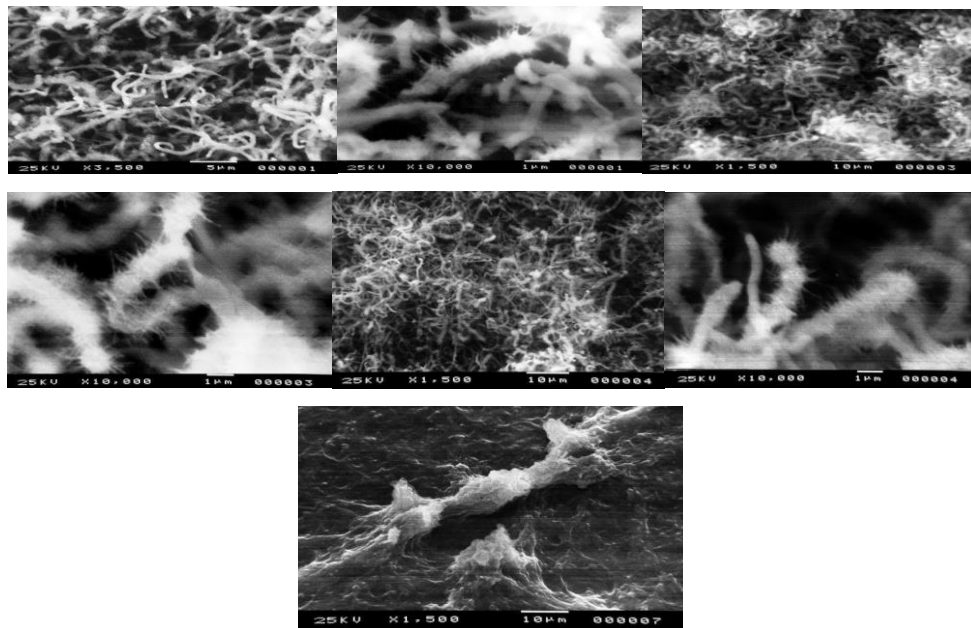


Рис. 3.3. Морфологічна різноманітність колоній *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 під електронним мікроскопом (збільшення 3.5 і 10 тис разів)

Проаналізувавши низку чашок, у кількох повторах, дійшли висновку, що більшого морфологічного і фізіологічного різноманіття *Streptomyces viridosporus* ATCC14672 можна досягнути вирощуючи їх на вівсяному агарі. Тут морфологія колоній варіювала за такими параметрами: форма колоній, їх розміри, колір повітряного і субстратного міцелію, інтенсивність спороутворення, характер пігментації та морфологія країв колоній. Тому для подальшого виділення клонів та пересіву з метою виявлення морфологічних та фізіологічних мінливостей *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 використовували колонії, які були вирощені саме на вівсяному середовищі з висівками.

З чашки [рис. 3.4] було точково відібрано та посіяно на вівсяне середовище 6 клонів.

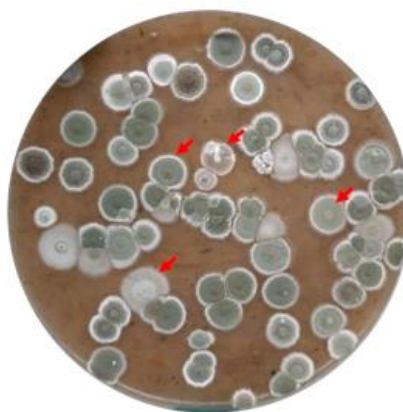


Рис. 3.4. Фотографія чашки з колоніями *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672, з якої виділили морфологічно відмінні лінії. 7 днів росту, ОМ

На підставі морфологічного аналізу з цих шести ліній виокремлено чотири морфотипи *S. viridosporus* ATCC 14672 (клони 1,3,4,7), які демонстрували сталість фенотипових ознак після 7 пасажів на твердому середовищі [рис. 3.5].

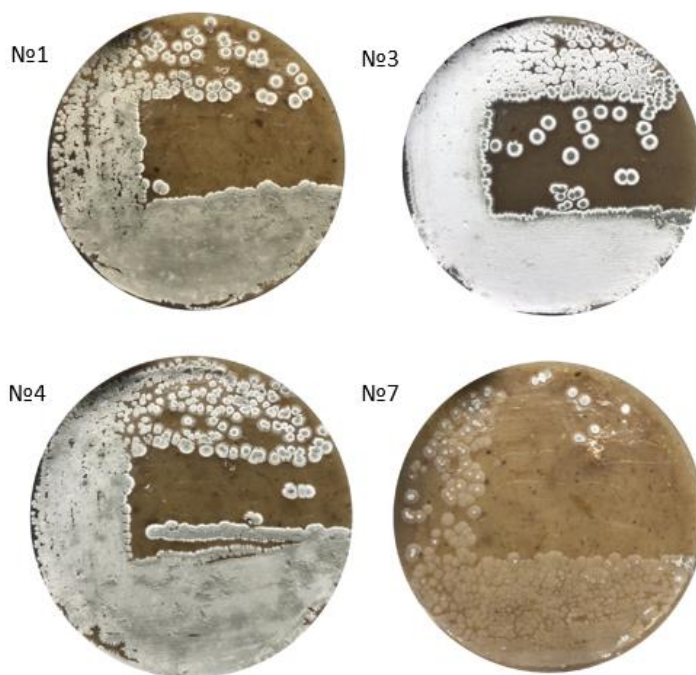


Рис. 3.5. Чотири стабільні лінії *S. viridosporus* ATCC14672. 4 доби росту, ОМ, 30 °С

Колонії клону № 1 формують добре розвинений повітряний міцелій із характерною зморшкуватою текстурою. Центральна частина колонії вкрита щільним сіруватим повітряним міцелієм зі світло-зеленим відтінком, що є характерним маркером для даного штаму. Субстратний міцелій помірно виражений, структура колонії зерниста. Наявність зморшкуватої поверхні вказує на активне спороутворення.

Морфологія колоній клону № 3 відповідає типовому дикому типу штаму *S. viridosporus*. Типовий морфотип з високим ступенем морфологічної однорідності, притаманний природному штаму без штучної селекції. Повітряний міцелій густий, сіруватий із вираженим світло-зеленим тоном. Краї колоній чітко окреслені, ріст радіальний. Пігментація середовища помірна, субстратний міцелій добре сформований. Спороутворення активне, однорідне, що є типовою ознакою дикого ізоляту.

Клон № 4 відзначений сірим забарвленням колоній і помірною споруляцією, що може вказувати на часткову зміну метаболічних процесів або експресії генів, відповідальних за спороутворення та пігментацію.

Клон № 7 має значно спрощену морфологічну організацію. Повітряний міцелій практично відсутній — колонія має гладку, блискучу поверхню кремово-бежевого кольору. Структура колонії дрібнозерниста, краї нерівномірні, ріст асиметричний. Субстратний міцелій слабо виражений. Ці характеристики свідчать про значні зміни у генетичних або регуляторних механізмах споруляції.

Після семи пасажів спостерігали збереження морфологічних ознак відібраних клонів [рис. 3.6].

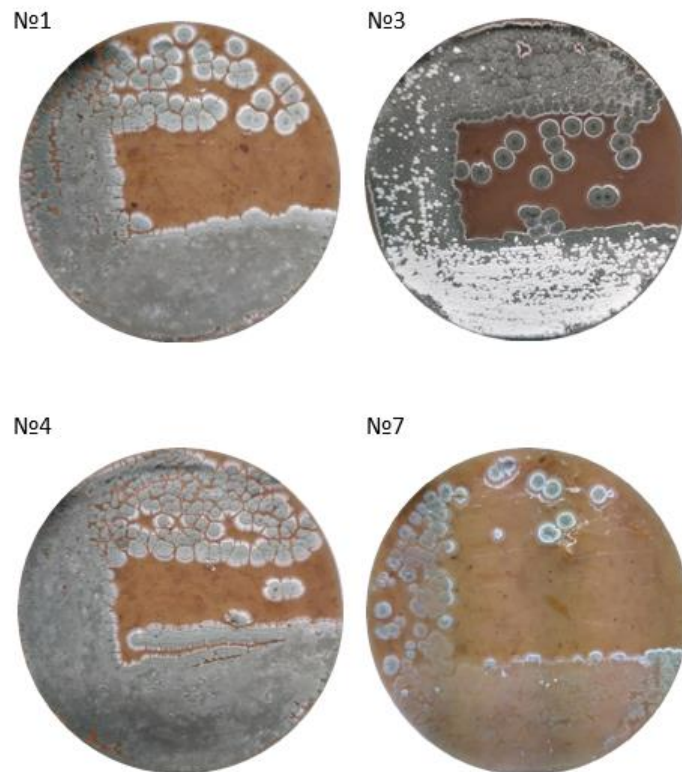


Рис. 3.6. Чотири стабільні лінії *S. viridosporus* ATCC14672. 8 діб росту, ОМ, 30 °С

Отримані результати свідчать, що колонії *S. viridosporus* ATCC 14672 демонструють виражену морфологічну мінливість, зумовлену, імовірно, внутрішньопопуляційною гетерогенністю та адаптивною реакцією на

середовищні чинники. Мінливість проявлялася як у зміні структури та пігментації колоній, так і в інтенсивності спороутворення залежно від складу середовища [рис. 3.7].

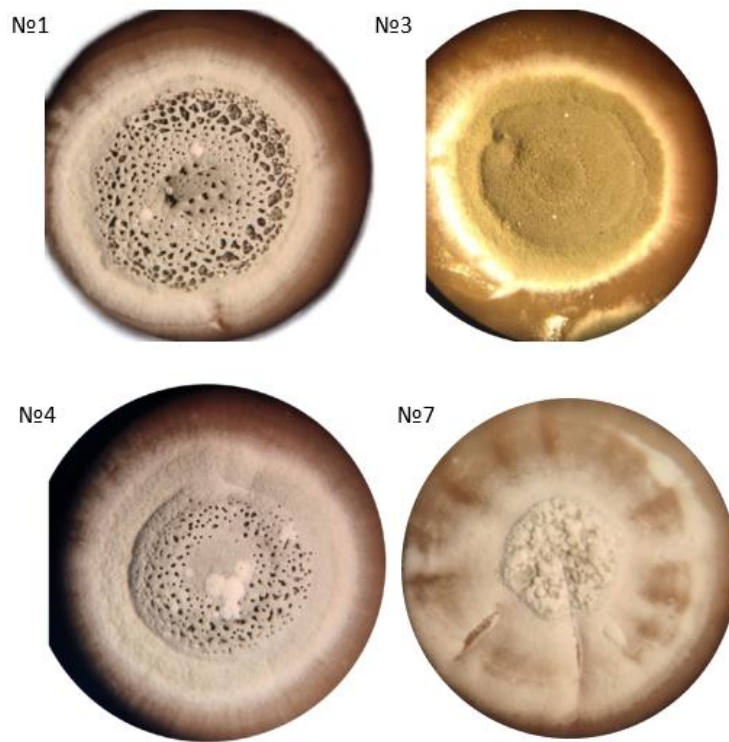


Рис. 3.7. Фотографії колоній під бінокулярним мікроскопом. 10 діб росту, ОМ, 30 °С

3.2. Кількісна оцінка утворення морфологічно відмінних ліній *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 із вихідної культури

Одним із ключових етапів кількісної оцінки морфологічної мінливості вихідної культури *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 був аналіз частоти появи колоній з нетиповим забарвленням серед потомства дикого типу. Для цього було здійснено висіви вихідної культури на тверде поживне середовище з висівками (ОМ) з подальшим підрахунком колоній на п'яти чашках Петрі, інокульованих четвертим за порядком розведенням. Такий підхід забезпечив репрезентативність вибірки та дозволив оцінити спонтанний рівень формування морфологічно відмінних ліній у стандартизованих умовах культивування.

Отримані результати свідчать, що загальна кількість колоній на окремих чашках варіювала в межах від 54 до 136, що є типовим для стрептоміцетів при використанні серійних розведень. Частка колоній білого або сірого забарвлення, які розглядалися як потенційно відхилені морфотипи, становила від 2 до 5 колоній на чашку. У відсотковому співвідношенні це відповідало приблизно 2,7–7,4% від загальної кількості колоній для кожного повтору. Виявлена частота відхилених варіантів може свідчити про наявність базового рівня морфологічної нестабільності у вихідної культури, що узгоджується з відомими тенденціями до спонтанної варіабельності у роді *Streptomyces*.

Сукупність отриманих даних дозволяє припустити, що навіть за умов вирощування без додаткових стресових факторів у популяції *S. viridosporus* зберігається певний рівень морфологічно відмінних клонів, які можуть відображати зміни у споруляції, пігментації або структурі міцелію.

3.3. Стабільність спадковості морфологічних ознак у повторних пасажах

Одним із важливих аспектів дослідження мінливості *Streptomyces viridosporus* ATCC14672 є вивчення стабільності морфологічних ознак у повторних пасажах. Така оцінка дозволяє встановити ступінь консервативності фенотипових характеристик у наступних генераціях, що має істотне значення як для базових мікробіологічних досліджень, так і для прикладних задач, зокрема селекції стабільних продуцентів біологічно активних речовин.

Кожен із морфотипів (1,3,4,7) було далі піддано повторним пересівам за стандартною методикою на агаризованому середовищі з висівками з підтриманням температурного режиму у 30°C.

У перших пасажах кожного морфотипу зберігалися ключові морфологічні ознаки, що дозволило попередньо класифікувати їх як стабільні [рис. 3.5, 3.6]. Так, колонії після повторного пересіву зберегли характерний колір і форму.

Клон № 3, тобто дикий тип виявився стабільним, та не проявив змін у своїй морфології [рис. 3.8].

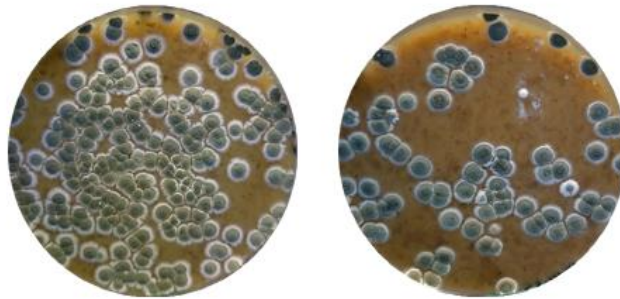


Рис. 3.8. Стабільність варіанту №3. 5 пересівів

Ці результати свідчать про часткову стабільність цього морфотипу.

Клони №1 та №4 проявили незначну варіабельність: у деяких випадках з'явилася більша споруляція, а також зміни в рельєфі колоній. Клон № 7 зберігав свою властивість не спорулювати та не проявляти пігментації [рис. 3.9]. Клон № 3, тобто дикий тип виявився стабільним, та не проявив змін у своїй морфології.

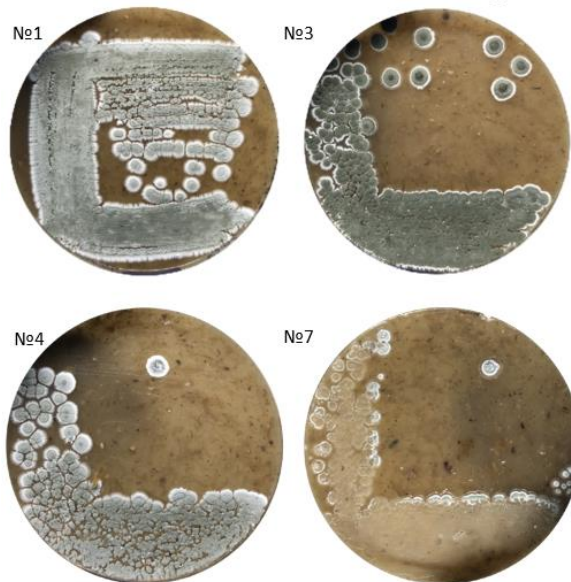


Рис. 3.9. Чотири лінії *S. viridosporus* ATCC14672 після повторного пересіву. 7 діб росту, ОМ 30 °С

Особливої уваги заслуговують результати експерименту із вирощуванням клонів при температурі 35°C [рис. 3.10].

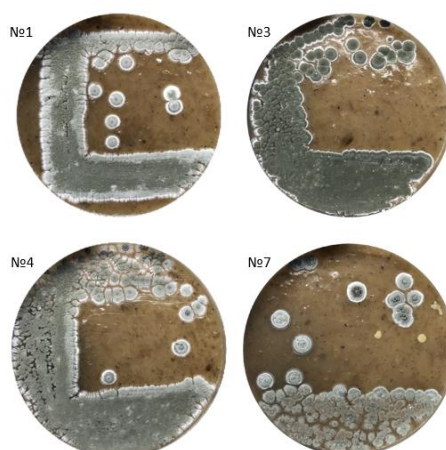


Рис. 3.10. Чотири лінії *S. viridosporus* ATCC14672 після вирощування за температури 35°C. ОМ, 7 діб росту

Підвищена температура сприяла появі морфологічних варіацій у кількох клонів. Зокрема, зміни фіксувалися у клону 7, зокрема підвищена споруляція, та поява зеленого кольору колоній. Водночас, клони 1, 3 та 4 виявили високу стабільність морфологічних ознак незалежно від температурного режиму.

Більшість досліджених морфотипів *Streptomyces viridosporus* ATCC14672 демонструють виражену спадкову стабільність морфологічних характеристик при серії пересівів. Найвищу стабільність проявили клони №1 та №3, які зберігали ключові фенотипові риси незалежно від змін температурного режиму. Клон №4, незважаючи на часткову мінливість у споруляції, залишався у межах вихідного морфотипу. Клон №7 показав здатність до адаптивних змін при підвищеній температурі, що свідчить про існування пластичних механізмів регуляції морфогенезу в межах одного генотипу, проте не втратив своїх морфологічних характеристик при вирощуванні за температури 30 °C .

3.4. Оцінка антибіотичної активності та чутливості морфотипів

Дослідження антибіотичної активності морфотипів *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 було проведено з метою встановлення потенційного

зв'язку між морфологічною варіабельністю штамів та їх здатністю синтезувати антибіотики. В експерименті особливу увагу було приділено чотирьом морфотипам (клони 1,3,4,7), відібраним з популяції *S. viridosporus* після багаторазових культивувань.

Оцінка сумарної антибіотичної активності проводилася двоетапно: на першому етапі використовувалося класичне середовище TSA, на другому — середовище STSBA, яке слугувало альтернативною платформою для перевірки відтворюваності результатів.

Біотестування *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 на сумарну антибіотичну активність з використанням середовища TSA показало, що розміри зон затримки росту всіх досліджуваних клонів коливалися у межах 9–10 мм, що свідчить про збереження антибіотичної активності незалежно від морфотипу колонії. Усі вибрані клони проявляють антибіотичну активність [рис. 3.11]. Для біотесту використовували клони 1,3,4,7, які попередньо були вирощені на середовищі з TSA за температури 30°C. Організмом, чутливим до дії антибіотиків *Streptomyces viridosporus* ATCC14672 був *Bacillus cereus*.

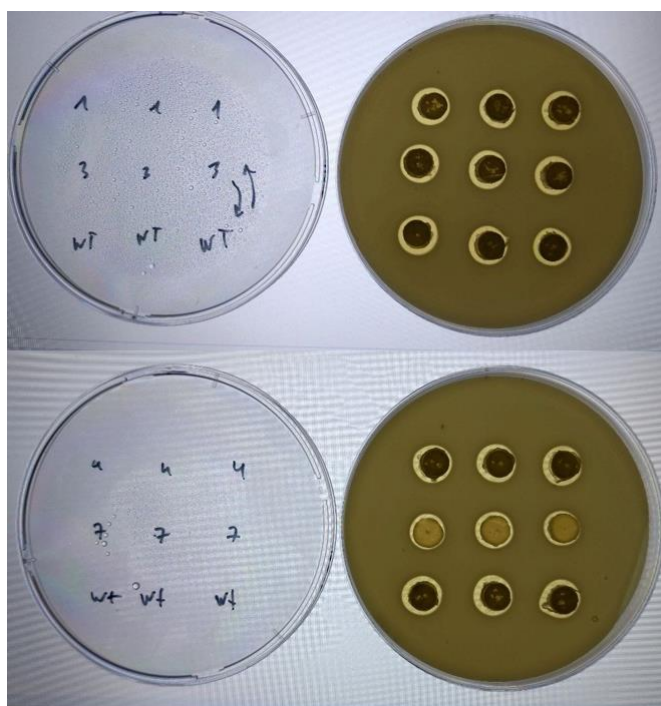


Рис. 3.11. Результати біотестування *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 на сумарну антибіотичну активність. Середовище TSA. 8 день росту

За результатами біотестування на середовищі TSA, усі клони, включно з диким типом, продемонстрували подібний рівень антибіотичної активності. Клон №1 мав стабільну активність (триразовий вимір – по 9 мм), тоді як дикий тип та клони №3 і №4 демонстрували подібну або трохи вищу активність (до 10 мм). Клон №7 виявляв активність на рівні 8 – 9 мм.

Також для репрезентативності результатів було проведено біотестування антибіотичної активності *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 з клоном №3 та №7 [рис. 3.12].

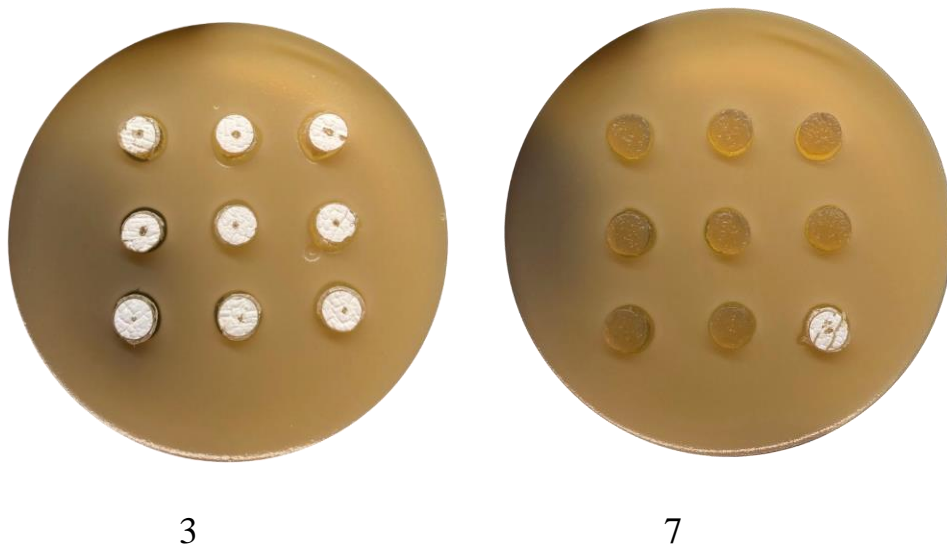


Рис. 3.12. Біотестування антибіотичної активності *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672. Клон №3 та №7. 30°C, TSA, 1 доба росту

За результатами цього біотесту клон №3 та №7 виявили подібну антибіотичну активність (в межах 8-10 мм), що підтверджує стабільність синтезу антибіотиків цими штамми.

Для підвищення достовірності отриманих результатів сумарну антибіотичну активність клонів №3 та №7 було протестовано повторно. Клон №7 демонстрував відносно високу та стабільну інгібуючу активність. На першій чашці діаметри зон затримки росту варіювали від 11 до 13 мм, із чіткою тенденцією до збільшення інгібування в третьому ряду. На другій чашці

результати залишалися подібними (11–13 мм). У середньому активність клону №7 становила близько 12 мм, що є помітно вищим за попередні вимірювання, виконані на середовищі TSA. Така варіабельність може бути пов'язана як із фізіологічним станом культури на момент висіву, так і з відмінностями у швидкості дифузії метаболітів у конкретній партії поживного середовища.

Дикий тип (*wt*) продемонстрував нижчу активність порівняно з клоном №7, проте його результати також були стабільними між повторними пробами. На двох незалежних чашках діаметри зон інгібування коливалися в межах 9–11 мм, що відповідає раніше отриманим значенням для вихідної культури. У середньому активність *wt* становила близько 10 мм і була нижчою за показники клону №7 приблизно на 2 мм. Виявлена різниця може свідчити про певні фізіологічні або регуляторні особливості клону №7, які потенційно впливають на інтенсивність синтезу антибіотиків.

З метою уточнення потенційної кореляції між морфотипом і антибіотичною активністю було закладено додатковий біотест на середовищі STSBA [рис. 3.13].

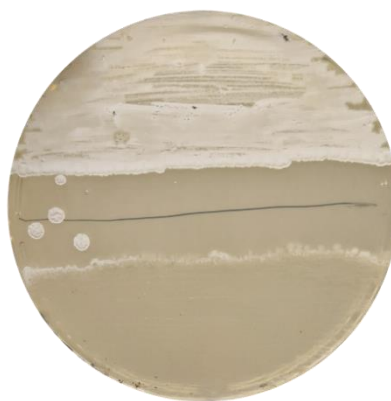


Рис. 3.13. Клон 3 (зверху), та клон 7 (знизу) вирощені на середовищі STSBA. 30°C, 5 діб росту

Для цього повторно посіяли на середовище TSA клон №7 та №3 (дикий тип), та вирощували протягом 5 діб за температури 30°C .

Результати вказали на схожий рівень антибіотичної активності, проте клон №3 вирізнявся трохи більшими зонами пригнічення росту *Bacillus subtilis* (11 – 12 мм). Клон №7 утворював зони розміром ~ 8 мм. [рис. 3.14].

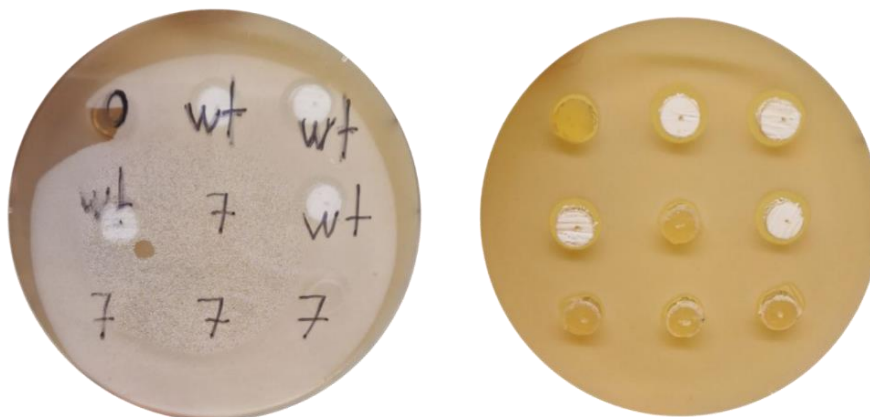


Рис. 3.14. Результати визначення сумарної антибіотичної активності *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 з використанням середовища STSBA

Отже, у межах проведеного експерименту спостерігаємо чітку залежність між морфотипом та рівнем сумарної антибіотичної активності. Середовище STSBA специфічно вплинуло на рівень сумарної антибіотичної активності клону №3. Клон №7 залишився на тому ж рівні синтезу у порівнянні з попередніми дослідженнями [рис. 3.11, 3.12].

Для того, щоб якісно визначити чи речовина з антибіотичними властивостями яка продукується клоном №7, що відрізняється за морфологічними та фізіологічними властивостями від клону №3 (WT), відноситься до групи моеноміцинів, було проведено екстрагування моеноміцину з клону №7 та культури дикого типу *S. viridosporus* ATCC14672. Результати ТШХ (тонкошарової томографії) та біотесту з використанням тест – чутливої до моеноміцинів бактерії *Bacillus subtilis* та стерильних дисків насичених речовиною з антибіотичною активністю що була виділена із клону №7 вказують на те, що клон №7 здатний до синтезу фосфогліколіпідних антибіотиків групи моеноміцинів, зокрема моеноміцинуА (MmA) [рис. 3.15].

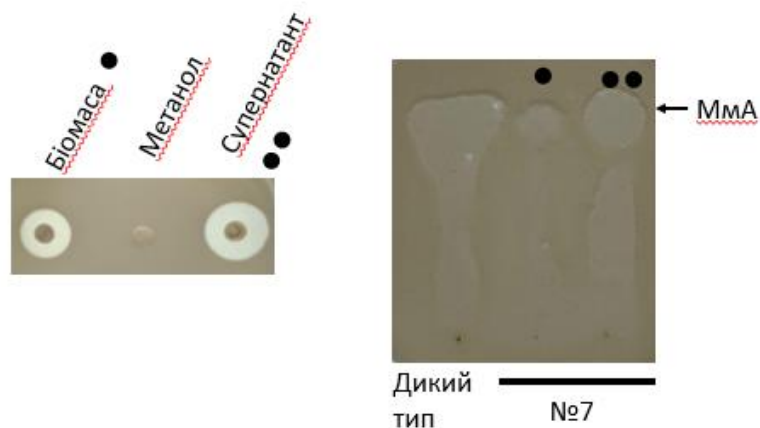


Рис. 3.15. Ліворуч – сумарна антибіотична активність клону № 7 з використанням супернатанту та біомаси виділених з культури № 7 вирощеної в рідкому середовищі (5 діб, TSB), праворуч – результати тонкошарової хроматографії (ТШХ). Середовище TSA з *Bacillus subtilis*, 1 день росту

Загалом, дані з усіх біотестів на визначення сумарної антибіотичної активності підтверджують репродуктивність фенотипової характеристики клонів у різних умовах.

Окремим блоком у дослідженні виступало вивчення чутливості штамів до дії антибіотиків за допомогою диско-дифузійного методу. Тест проводився на штаммах №3 (дикий тип) та №7 (лисий фенотип) за участі 13 антибіотиків, що діють на різні мішені клітини: синтез клітинної стінки, білка, ДНК, РНК, а також клітинну мембрану [табл. 3.1].

Таблиця 3.1

Антибіотики, що використовувались для диско – дифузійного методу, та їх клітинні мішені

Антибіотик	Мішені
Цефтазидим	Клітинна стінка
Цефепім	Клітинна стінка

Ампіцилін	Клітинна стінка
Новобіоцин	Синтез ДНК
Ванкоміцин	Клітинна стінка
Еритроміцин	Синтез білка
Неоміцин	Синтез білка
Тетрациклін	Синтез білка
Поліміксин	Мембрана
Рифампіцин	Синтез РНК
Мономіцин	Синтез білка
Ципрофлоксацин	ДНК – гіраза
Тіострептон	Синтез білка

Результати свідчать про значну відмінність у чутливості між досліджуваними штамми. Зокрема, штам №7 мав значно більші зони інгібування до таких антибіотиків, як канаміцин/неоміцин/гентаміцин (до 45 мм), тетрациклін (до 43 мм), рифампіцин (до 37 мм), мономіцин (до 38 мм) і ципрофлоксацин (до 35 мм). Натомість дикий тип демонстрував суттєво менші зони (наприклад, 22 мм для канаміцину, 20 мм для тетрацикліну, 27 мм для рифампіцину) [табл. 3.2, рис. 3.15]. У всіх випадках похибка становила не більше 2 мм.

Таблиця 3.2.

Результати замірів зон інгібування росту *Streptomyces viridosporus* ATCC

14672. 2 доба росту

Антибіотик (мкг/диск)	Клон №3 (мм)	Клон №7 (мм)
Цефтазидим (20)	0	0
Цефепім (20)	0	0
Ампіцилін (50)	0	0

Новобіоцин (7)	29	35
Ванкоміцин (5)	24	34
Еритроміцин (30)	9	18
Неоміцин (30)	22	45
Тетрациклін (15)	20	41
Поліміксин (10)	8	8
Рифампіцин (10)	27	32
Мономіцин (15)	15	38
Ципрофлоксоцин (15)	31	35
Тіострептон (30)	11	16

Цікаво, що обидва штами залишалися стійкими до бета-лактамних антибіотиків — цефтазидиму, цифепіму, а також ампіциліну, хоча останній іноді давав незначні зони затримки росту (до 13 мм у окремих випадках). Це вказує на можливу природну резистентність до даного класу препаратів. Для отримання надійного результату (визначення похибки експерименту) цей дослід буде повторено.

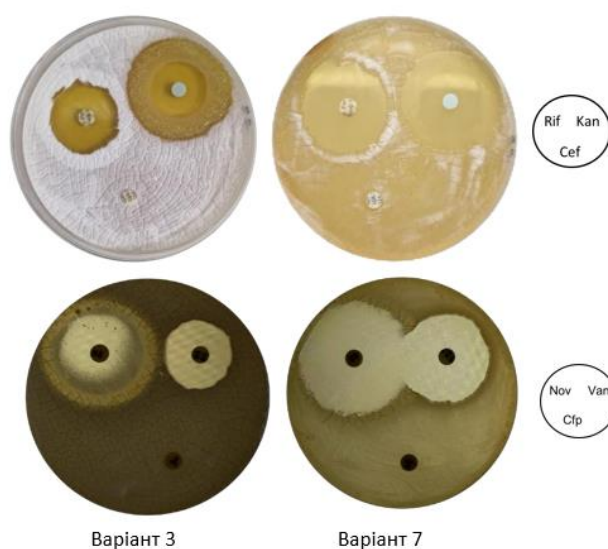


Рис. 3.16. Зони інгібування росту *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672 вибраними антибіотиками. 2 доба росту, TSA, 30°C

Найбільша розбіжність у чутливості між клонованими варіантами спостерігалася саме для антибіотиків, що впливають на синтез білка (наприклад, тетрациклін, мономіцин, тіострептон), а також на РНК-полімеразу (рифампіцин). Ці дані дозволили зробити припущення про потенційні зміни у клітинному метаболізмі або мутації у відповідних генах у клону №7.

З метою уточнення цих відмінностей було проведено додатковий диско-дифузійний тест з трьома антибіотиками — еритроміцин/олеандоміцин, левофлоксацин, тетрациклін. Результати трьох замірів протягом трьох діб підтвердили попередні спостереження: клон №7 продемонстрував вищу чутливість до тетрацикліну (до 38 мм) проти 21–24 мм у дикого типу, тоді як для левофлоксацину та еритроміцину різниця була менш вираженою [табл. 3.3].

Таблиця 3.3.

Результати замірів зон інгібування росту *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672. 2 доба росту

Антибіотик	Клон №3 (мм)	Клон №7 (мм)
Еритроміцин	13	14
Левовфлоксацин	14	14
Тетрациклін	23	38

Результати свідчать, що ATCC 14672 виявляє значну міжклональну варіабельність у чутливості до антибіотиків, яка корелює з морфологічними особливостями. Хоча сумарна антибіотична активність (тобто власне продукція антибіотиків) була подібною у досліджених клонів, їх чутливість до сторонніх антибіотиків відрізнялася суттєво. Це дозволяє припустити, що в основі спостережуваних відмінностей лежать генетичні варіації, які можуть впливати на експресію генів резистентності або структуру клітинних мішеней.

3.5. Вплив ко-культивування морфологічно відмінних ліній на спороутворення

Для вивчення мінливості та адаптаційного потенціалу *Streptomyces viridosporus* ATCC14672 було проведено експеримент, спрямований на аналіз впливу ко-культивування морфологічно відмінних клонів на здатність до спорування. Особлива увага приділялась лініям з вираженими відмінностями у морфології, зокрема клону №3 (дикий тип, з нормальною споруляцією) та клону №7 (лісий морфотип, практично неспорууючий). Також проводилось ко – культивування усіх чотирьох морфологічно відмінних ліній на середовищі GYM. На 1–2 день росту суттєвих змін не спостерігалось, однак вже з 3–4 дня фіксувалися замітні ознаки споруляції у клону 7 у зонах ко-культивування з клоном 3 на середовищі TSA, а також 7 клону з клонами 1, 3 та 4 на середовищі GYM [рис. 3.17].

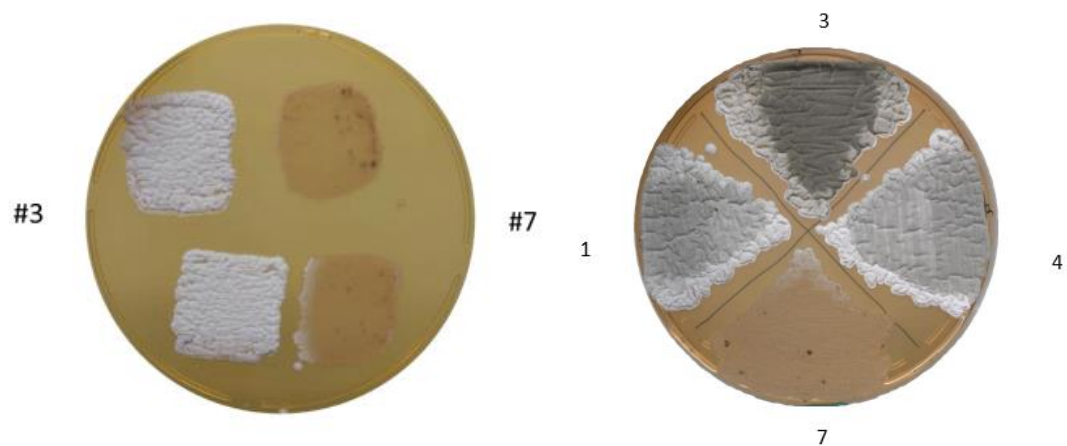


Рис. 3.17. Обмін метаболітами між клонами. Ліворуч – TSA, 30°C, 3 дні росту. Праворуч – GYM, 30°C, 5 днів росту

У місцях, де відстань між культурами була мінімальною, з'являлися слабо забарвлені повітряні міцелії, що не реєструвалися при монокультурному вирощуванні клону 7. Це вказує на можливу індукцію спорування шляхом міжклітинних хімічних сигналів. У контрольних ділянках (з відстанню ~1 см – рис. ліворуч) клон 7 залишався неспорууючим. Морфологічні зміни у клону 7 мали обмежену зону прояву — лише в радіусі до 5 мм від колоній інших

клонів. Це дозволяє припустити, що діючий індуктивний агент або є нестабільним, або локалізується у вигляді градієнту у щільному середовищі агарозного шару.

Таким чином, експеримент із ко-культивуванням дозволив виявити цікаве явище міжклітинної взаємодії, в основі якого, ймовірно, лежить сигнальна індукція спороутворення за рахунок виділення низькомолекулярних метаболітів дифузійної природи.

3.6. Біоінформатичний аналіз результатів секвенування геномів морфологічно відмінних ліній *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672

Після отримання високоякісної ДНК клонів №1, 3 та 7 [рис. 3.18] та її секвенування (лабораторія проф. Й. Каліновскі, ун-т Білефельда) було здійснено комплексну обробку та інтерпретацію секвенованих даних із використанням інструментів платформи Galaxy.

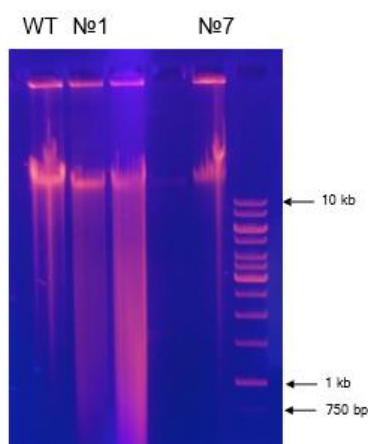


Рис. 3.18. Результати гелю – електрофорезу ДНК, виділеної зі штаму дикого типу (WT) та морфологічно відмінних клонів №1 і №7 *Streptomyces viridosporus* ATCC 14672

Провівши аналіз, який включав оцінку якості рідів [додаток 1], складання геномних послідовностей, функціональну анотацію та порівняння отриманих геномів вдалося виявити структурні відмінності між лініями. Після застосування таких інструментів, як FastQC, Flye, Prokka та D-GENIES, дало змогу отримати

цілісне уявлення про геномну організацію досліджуваних морфотипів і виявити можливі генетичні чинники, що лежать в основі їхніх морфологічних особливостей.

Після завершення складання геномних послідовностей важливим етапом стала оцінка їхньої узгодженості та цілісності. Оскільки секвенування здійснювалося технологією Oxford Nanopore, яка передбачає незалежне складання контигів для кожного зразка, постала необхідність перевірити, наскільки отримані збірки коректно відображають реальну структуру геному *S. viridosporus*. З цією метою спочатку було виконано порівняння різних варіантів збірок одного й того самого зразка, використовуючи dot-plot візуалізацію як інструмент оцінки відповідності між послідовностями.

Такий підхід дозволив продемонструвати типові для актинобактерій особливості, зокрема характерні інверсії великих ділянок геному. Геном *Streptomyces* є лінійним, і під час складання він може бути орієнтований у протилежних напрямках залежно від того, з якого кінця розпочинається збірка. Це призводить до формування ділянок, що в dot-plot виглядають як великий діагональний сигнал з негативним нахилом, відображаючи інверсію відносно іншої збірки. В окремих регіонах також можуть спостерігатися розриви гомології, що є наслідком різної якості збирання кінцевих областей або неоднозначного вирівнювання повторюваних послідовностей.

Щоб продемонструвати як аналізувалися результати дотплотів проведено аналіз лінійної мапи гомологій і dot-plot порівняння між збіркою штаму дикого типу, отриманою в лабораторії проф. Й. Каліновскі (ун-т Білефельда), та збіркою морфологічно відмінного клону №1, що походить із тієї ж лабораторії [рис. 3.19].

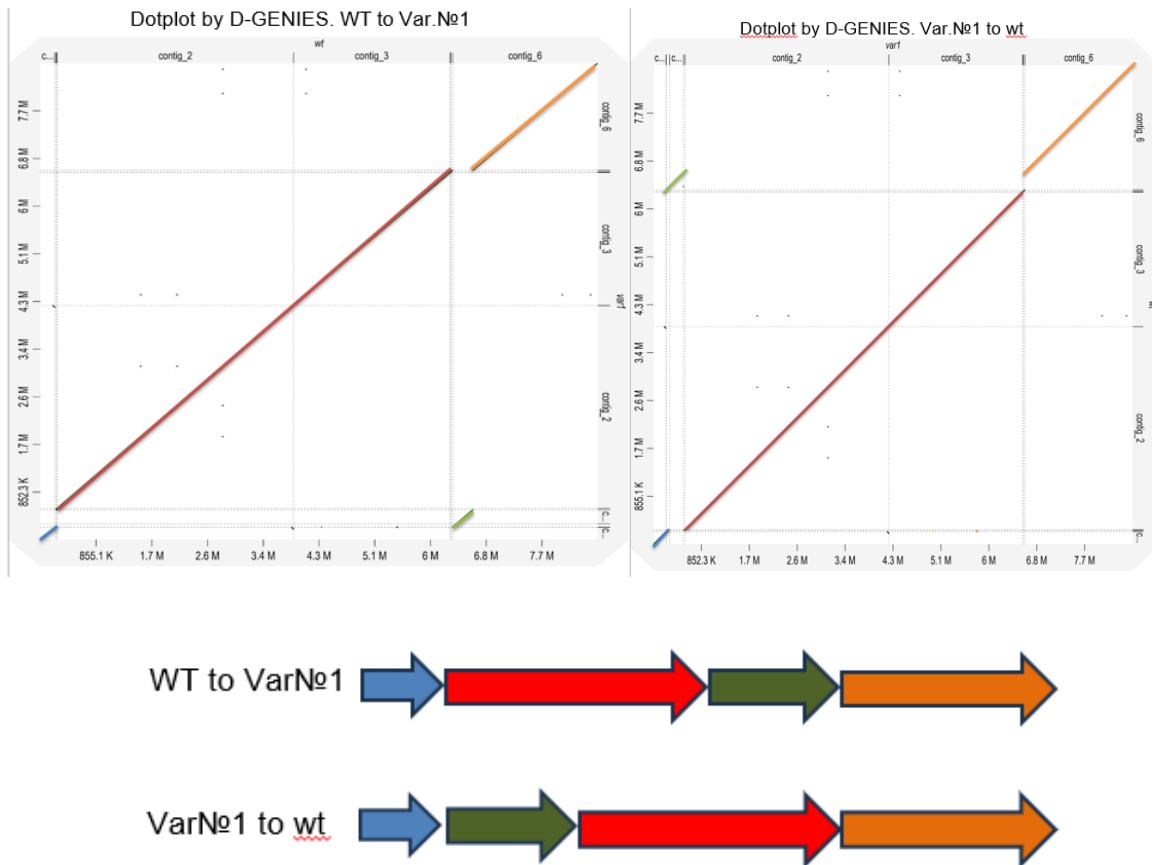


Рис. 3.19. Лінійна мапа гомологій для порівняння геномів WT та Var№1. На рисунку представлено два дотплоти, що відображають вирівнювання геномних збірок у двох напрямках: WT \rightarrow Var№1 (ліворуч) та Var№1 \rightarrow WT (праворуч). Лінії на дотплотах позначають гомологічні ділянки, а їхнє забарвлення відповідає кольорам ділянок, нанесених на лінійні діаграми під графіками. Лінійні діаграми слугують візуальним орієнтиром для інтерпретації порядку та орієнтації гомологічних регіонів під час порівняння збірок

При порівнянні WT до Var№1 спостерігається послідовність гомологічних ділянок, що відповідає порядку контигів у варіанті Var№1. Спершу наявна коротка гомологічна ділянка, що відповідає 1-му контигу, далі велика безперервна ділянка, яка охоплює 2-й та 3-й контиги, після неї — невеликий фрагмент, що відповідає 4-му контигу, і завершальна гомологічна ділянка, що належить 6-му контигу.

У зворотному порівнянні Var№1 до WT порядок гомологічних блоків змінюється відповідно до розташування ділянок у геномі WT (транслокація). У цьому випадку спершу вирівнюється фрагмент 1-го контигу, за ним — ділянка, що відповідає 4-му контигу, далі — великий фрагмент, який включає 2-й та 3-й контиги, а заключною є ділянка 6-го контигу.

Таким чином, представлені дотплоти разом із лінійними схемами демонструють відповідність гомологічних ділянок між двома збірками та дозволяють візуалізувати зміну їхнього порядку залежно від порівняння.

Проте, приклад оцінення глобальної структури генома ATCC14672 спочатку був виконаний на основі наявних збірок генома дикого типу. Станом на 2025 р. таких до наших послуг є принаймні три. Перша – це геном варіанту №3, який ми розцінюємо як дикий тип за морфологією та синтезом моеноміцину. Цей зразок позначаємо як WT. Далі, у попередніх роботах працівників НДЛ-42 був складений геном дикого типу, починаючи з генно-інженерного мутанта dO5. Це, мабуть, найповніша збірка генома ATCC14672, що міститься в одному контигу. Його позначили як dO5_converted_to_wt. Нарешті, у базі NCBI наявний геном ATCC14672 секвенований в інституті Броуда, США. Ця збірка репрезентована трьома великими контігами і низкою дрібних, з її відомих недоліків – уведене до складу хромосоми плазмиди pSG2, що є, як відомо, реплікативною. Цей зразок має назву ATCC14672_Broad. Тому свою роботу ми розпочали із порівняння збірок геномів ATCC14672 дикого типу. Нижче наведений dot-plot [рис. 3.20] слугує прикладом того, як структурні особливості лінійного геному та технічні аспекти асемблювання впливають на вигляд порівняльних карт гомології. Це попередній крок, що демонструє закономірності, необхідні для правильного інтерпретування подальших порівнянь між геномами різних морфологічних ліній.

Dotplot by D-GENIES. wt to wt chromosome

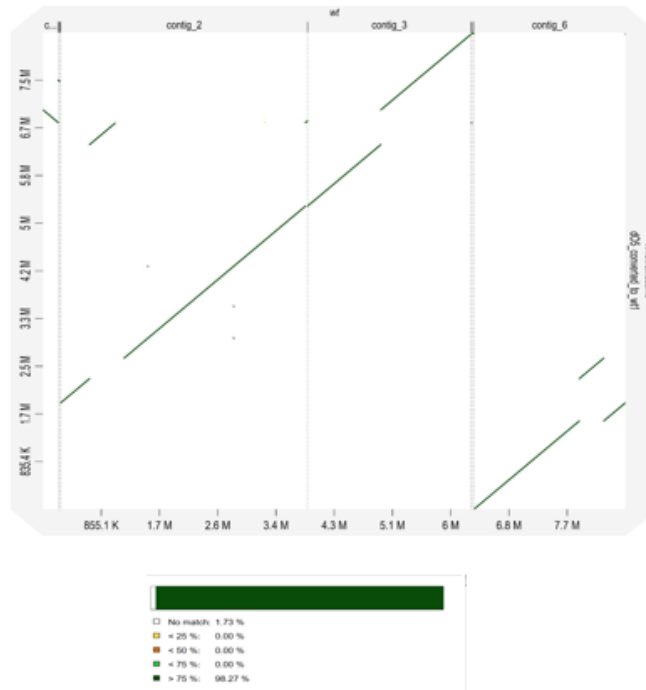


Рис. 3.20. Dot – plot аналіз двох збірок одного геному wt *S. viridosporus* ATCC 14672. WT – збірка лабораторії проф. Й. Каліновскі (ун-т Білефельда), D05_converted_to_wt – збірка [[annotation_dO5.zip](#)]

Отже, результати порівняння WT до dO5_converted_to_wt засвідчують пряму гомологію між двома геномами. Однак деякі ділянки одного генома відносно іншого – транслоковані. Це відображається як розриви діагональної лінії. Наприклад, ділянка в районі 0.8 млн п.н. у геномі WT знаходиться у районі 6.7 млн п.н. у геномі dO5_converted_to_wt. Це свідчить або про фактично різну локалізацію цієї ділянки у двох геномах, або недоліки збирання одного із геномів.

При порівнянні dO5_converted_to_wt з ATCC14672_Broad помітно загальну інверсію хромосоми одного зразка відносно іншого, а також деякі транслокації. [рис. 3.21]. Тут, швидше всього, маємо справу з різним підходом до визначення початку каркасу і його збирання (вибору початкової точки збирання генома).

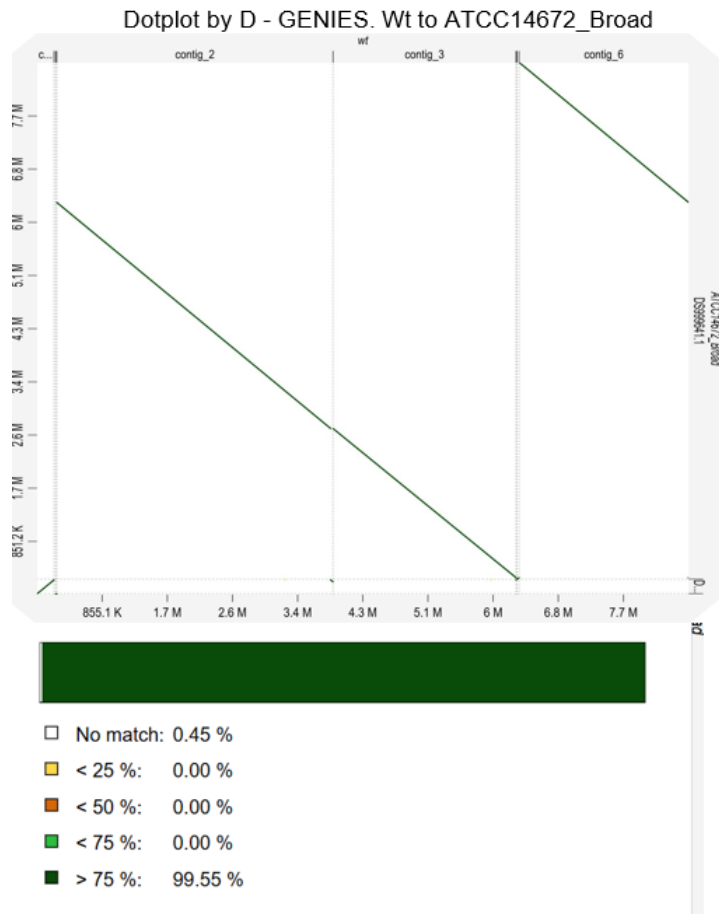


Рис. 3.22. Dot – plot аналіз D05_converted_to_wt з ATCC14672_Broad

Водночас, на початку дотплоту чітко простежується коротка ділянка з позитивним нахилом — тобто регіон, який не зазнав інверсії та зберіг однакову орієнтацію в обох збірках. Ця особливість може бути пов'язана з технічною специфікою збирання кінцевих областей лінійного геному, де рівень фрагментації відрізняються від тих, що характерні для центральних регіонів. Зокрема, кінцеві ділянки *Streptomyces* часто містять повторювані послідовності та мобільні елементи, що ускладнює їхнє узгоджене складання і нерідко призводить до локальних змін орієнтації. Загалом така конфігурація є характерною ознакою повної інверсії між двома збірками та підтверджує, що вони відрізняються лише орієнтацією, у якій було виконано асемблювання геному.

Окрім головного інверсійного сигналу, на дотплоті помітні також невеликі ділянки, що не вирівнюються між собою. Їхня частка становить 0,45% від загального об'єму послідовностей, що суттєво менше за порівняння попередніх збірок. Це може свідчити про їх кращу якість.

Отже, комплексний порівняльний аналіз кількох незалежних збірок *S. viridosporus* ATCC 14672 показав, що жодна з них не може бути однозначно визначена як референтна. Хоча всі варіанти збирання демонструють високу загальну відповідність між собою, кожен із них містить локальні розбіжності, зумовлені різною якістю реконструкції кінцевих ділянок, відмінностями в покритті, а також неоднозначностями, пов'язаними з повторюваними або мобільними елементами. Це робить будь-яку окрему збірку недостатньо репрезентативною для того, щоб слугувати єдиною точкою відліку в подальшому аналізі структурних особливостей геному.

Для з'ясування того, які саме структурні варіації можуть бути пов'язані з морфологічними відмінностями клонів, необхідним стало безпосереднє порівняння збірок, отриманих в однакових лабораторних умовах та за допомогою однакових методичних підходів.

Порівняння збірок одної лабораторії, які виконані в однакових умовах дозволяє мінімізувати вплив методичних артефактів та сфокусуватися безпосередньо на потенційних біологічних відмінностях між лініями.

Dot-plot порівняння варіанта №1 із збіркою штаму дикого типу демонструє майже повну відповідність між двома послідовностями [рис. 3.23].

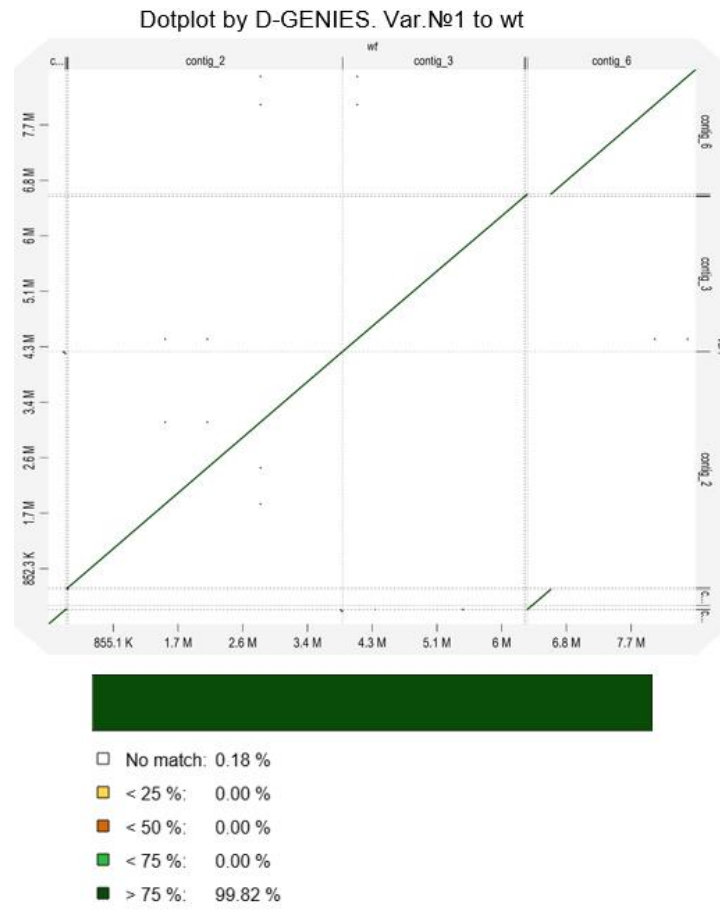


Рис. 3.23. Dot – plot аналіз клону №1 з wt *S. viridosporus* ATCC14672 одної збірки лабораторії проф. Й. Каліновські (ун-т Білефельда)

Основним структурним елементом графіку є безперервна діагональ із позитивним нахилом, що охоплює практично весь геном. Вона відображає наявність прямої (неінвертованої) гомології порівнюючи дикий тип до варіанта №1, тобто однакова орієнтація відповідних ділянок у двох збірках. Частка таких регіонів становить 99,82%, що свідчить про практично ідентичну організацію геномів у WT та Var№1. Проте, якщо порівнювати варіант №1 до wt виходить повна інверсія по усіх ділянках гомології, тому що графік у такому випадку необхідно читати з правої частини до лівої відповідно. Частка ділянок гомології становить 99,82%, що свідчить про практично ідентичну організацію геномів у WT та Var№1.

На графіку також присутні декілька коротких точкових сигналів поза головною діагоналлю, але їхній сумарний обсяг складає лише 0,18% від загальної довжини геному. Вони не формують суцільних ліній, і тому не свідчать про великі структурні перебудови, а радше відображають локальні різниці, притаманні межах контигів або технічним особливостям збирання та вирівнювання.

Відсутність інверсій окремих контигів або великих перебудов свідчить про те, що морфологічні відмінності варіанта №1 не пов'язані з макроструктурними змінами у геномі, а мають іншу природу — можливо, точкові мутації, дрібні інсерції/делеції або регуляторні відмінності, які не відображаються на рівні dot-plot.

Подальший етап аналізу був спрямований на визначення можливих структурних відмінностей між геномами морфологічно змінених ліній, отриманих в однакових експериментальних умовах. Особливу увагу приділено варіанту №7, оскільки він найбільше відрізнявся за морфологічними та фізіологічними показниками від інших клонів. Для цього здійснено dot-plot порівняння збірки варіанту №7 (тут позначений як var2) зі збіркою штаму #3 (var1, WT), які були отримані в лабораторії проф. Й. Каліновскі (ун-т Білефельда) за використання однакових методичних підходів.

Отриманий dot – plot [рис. 3.24] демонструє суттєві відхилення від варіанта №1, який показав майже повну відповідність геному дикого типу.

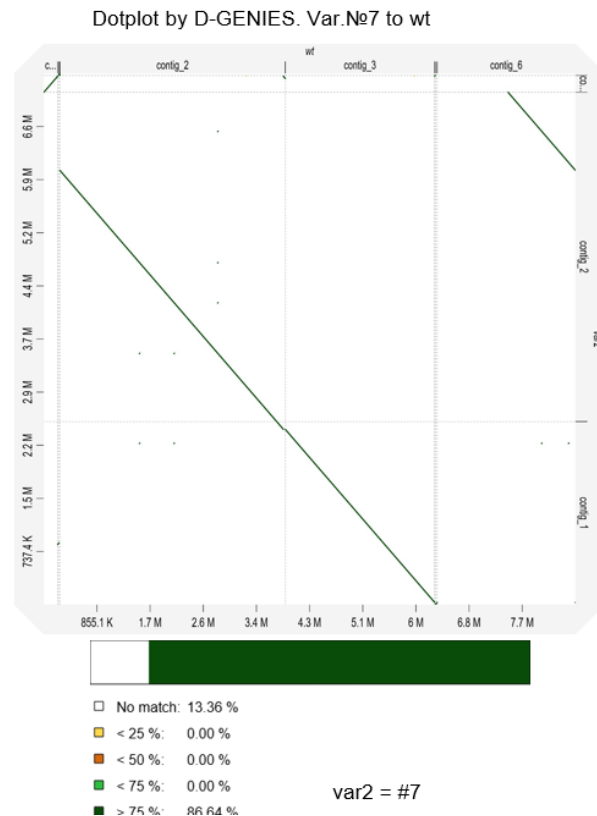


Рис. 3.24. Dot – plot аналіз клону №7 (var2) з wt *S. viridosporus* ATCC14672 одної збірки лабораторії проф. Й. Каліновскі (ун-т Білефельда)

У випадку варіанта №7 головним структурним елементом графіка також є протяжна діагональ з негативним нахилом (інверсія), що свідчить про збереження гомології між більшістю ділянок геному Var№7 та wt. Проте, у Var№7 спостерігається відсутність великої ділянки 6 контигу, що притамання WT. Про це свідчить розрив основної діагоналі. Тобто, маємо велику делецію в геномі клона №3, що охоплює приблизно 1 млн п.н. в районі умовного правого плеча хромосоми дикого типу (у діапазоні ~6.3–7.3 Mb). Такий характер змін є типовим для великих делецій, що охоплюють один або декілька контигів та не можуть бути пояснені технічними похибками збирання, оскільки у збірці дикого типу ця область представлена суцільним і добре вирівняним регіоном.

Окрім основної делеції, на графіку присутні також окремі короткі точкові сигнали поза діагоналлю, однак їхній обсяг є мінімальним і не формує структурально значущих перебудов. Такі елементи, найімовірніше,

відображають незначні локальні розходження, пов'язані з границями контигів або варіаціями у збиранні повторюваних регіонів, що характерно для геномів *Streptomyces*. Загальна частка невіривняних ділянок, окрім основної делеції, залишається порівняно невисокою та не перевищує значень, типових для інших порівнянь збірок цієї серії.

Важливо зазначити, що відсутність великого фрагмента геному може мати значний потенціал впливу на фенотип, зокрема на морфологічні особливості, що спостерігалися у варіанта №7. Провівши анотацію 6 контига дикого типу за допомогою інструменту Prokka у середовищі Galaxy вдалося відшукати гени, які могли вплинути на морфологічні та фізіологічні зміни у клону №7. Сюди відносяться гени, які можуть впливати на поділ клітин, морфогенез. Усі дані представлені у онлайн-таблиці [contig6_annot.xlsx](#)

Геноми стрептоміцетів характеризуються організацією, де кінцеві регіони хромосоми часто містять великі кластери генів вторинного метаболізму, регуляторні елементи та мобільні генетичні структури. Тому крупні делеції в цих областях часто супроводжуються змінами морфогенезу, пігментації, споруляції або антибіотикогенезу. Розташування делеції на рівні 6.3–7.3 Mb відповідає кінцевому сегменту лінійної хромосоми *Streptomyces*, що додатково може підтверджувати її потенційну біологічну значущість.

Порівнюючи геном варіанта №7 зі збіркою дикого типу D05_converted_to_wt можна зазначити, що він демонструє загальну подібність структурного профілю до попереднього аналізу [рис. 3.25]. Однак у геномі цього дикого типу ділянка, яка делетована у варіанті 7, присутня на лівому плечі хромосоми. Візуально графік повністю інвертований, що проявляється у вигляді діагоналей з негативним нахилом. Така картина характерна для глобальної інверсії або для розбіжностей у напрямку орієнтації контигів під час збирання. У випадку стрептоміцетів, лінійний характер хромосоми та можливі відмінності у способах реконструкції центрального та термінальних регіонів можуть легко

призводити до таких інверсій на рівні графічного представлення, не обов'язково відображаючи реальну біологічну інверсію.

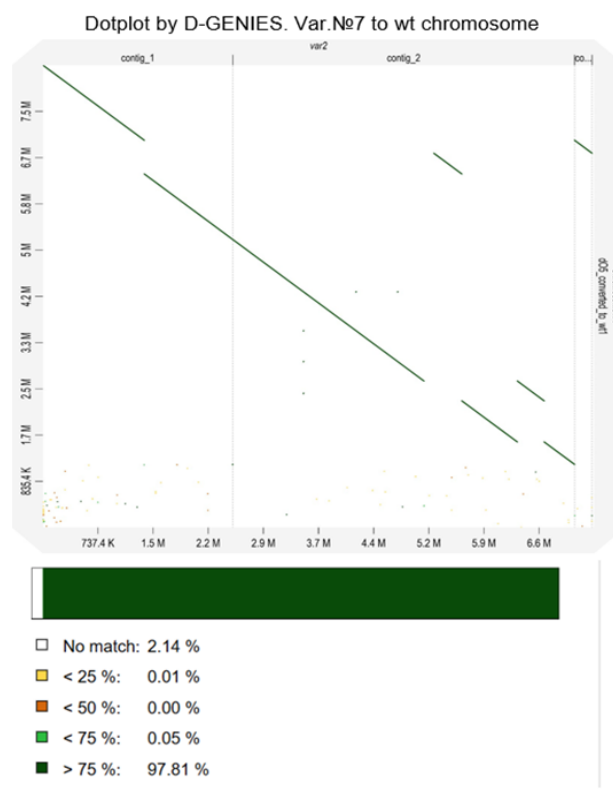


Рис. 3.25. Dot – plot аналіз клону №7 збірки лабораторії проф. Й. Каліновскі (ун-т Білефельда) з D05_converted_to_wt

Важливою відмінністю цього порівняння є те, що кількість гомологічних ділянок у Var№7 є помітно більшою, ніж у випадку використання збірки дикого типу лабораторії проф. Каліновскі.

Зокрема, на представленому графіку видно кілька довгих сегментів вирівнювання та значно більше коротших, що вказує на гірше перекриття між Var№7 та D05_converted_to_wt саме на рівні контигової організації. Це свідчить про те, що різні збірки wt можуть демонструвати різний ступінь подібності до експериментальних варіантів не лише через реальні біологічні відмінності, але й через особливості технології секвенування, глибини покриття, методів складання та обробки повторів.

Варто підкреслити, що інтерпретація подібних структурних особливостей неминуче залежить від того, яку саме збірку використовують як референтну. Різні збірки дикого типу можуть відрізнятися за довжиною контигів, кількістю пропущених повторів, коректністю полірування кінцевих ділянок та загальною контекстуальною організацією лінійної хромосоми. Саме тому інвертована діагональ і підвищена кількість вирівняних фрагментів у даному дотплоті можуть частково бути наслідком відмінностей у збірці.

ВИСНОВКИ

1. *Streptomyces viridosporus* ATCC14672 мінливий за морфологією колоній при вирощуванні на агаризованих середовищах. Особливо помітною ця мінливість була на вівсяному агарі, де частота трапляння нетипових колоній була у межах 10^{-4} – 10^{-5} .
2. Виділено чотири морфологічно відмінні лінії – №1, №3, №4, №7. Лінії №1 і №3, морфологічно найближчі до дикого типу, демонстрували високу консервативність ознак, незалежно від температури вирощування (30 або 35°C). Клон №4, хоча і виявив незначну варіабельність у пігментації та рельєфі колоній, залишався у межах стабільного морфотипу. Лінія №7, позбавлена спороутворення при 30°C, частково зазнавала відновлення спорулювання за вирощування при 35°C.
3. Незалежно від морфології колоній, усі досліджувані лінії здатні продукувати моеноміцини. При цьому за умов глибинного культивування клон №7 продукував моеноміцини на рівні не меншому ніж дикий тип.
4. Неспороутворююча лінія №7 може зазнавати відновлення утворення повітряного міцелію при вирощуванні поблизу з лінією №3. Це вказує, що в лінії №7 ймовірно пошкоджене функціонування механізмів дифузійної сигналізації через низькомолекулярні метаболіти.
5. Геном лінії №7 містить делецію великої ділянки хромосоми (приблизно 1 млн п.н.) на умовному правому “плечі” лінійної хромосоми, якщо за референтну послідовність обирати каркас генома варіанту №3. В геномі останнього ця ділянка містить низку генів з *whi*-, *fts*-родин, сигма- та антисигма-факторів, відсутність яких у №7, швидше всього, і зумовлює порушення процесів морфогенезу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. МАКІТРИНСЬКИЙ Р. П. Гени, що задіяні у регуляції біосинтезу моеноміцину А в актиноміцетів: дис. канд. біол. наук. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, 2012. 223 с.
2. Aguinaldo A. M., Turbeville J. M., Linford L. S., Rivera M. C. et al. Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2010. Vol. 54. № 3. P. 763–772. doi: 10.1016/j.ympev.2009.11.019.
3. Algora-Gallardo L., Schniete J. K., Mark D. R., Hunter I. S. et al. Bilateral symmetry of linear streptomycete chromosomes // *Microb Genom*. 2021. Vol 7. № 11. doi: 10.1099/mgen.0.000692
4. Andam C. P., Choudoir M. J., Nguyen A. V., Park H. S. et al. Contributions of ancestral inter-species recombination to the genetic diversity of extant *Streptomyces* lineages // *ISME Journal*. 2016. Vol. 10. № 7. P. 1731–1741. doi: 10.1038/ismej.2015.230
5. Andreani N. A., Hesse E., Vos M. Prokaryote genome fluidity is dependent on effective population size // *The ISME Journal*. 2017. Vol. 11, № 7. P. 1719–1721. doi: 10.1038/ismej.2017.36.
6. Antony-Babu S., Stien D., Eparvier V., Parrot D. et al. Multiple *Streptomyces* species with distinct secondary metabolomes have identical 16S rRNA gene sequences // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. №1. doi: 10.1038/s41598-017-11363-1.
7. Bao K., Cohen S. N. Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication // *Genes & Development*. 2003. Vol. 17. № 6. P. 774–785. doi: 10.1101/gad.1060303.
8. Bush M. J., Tschowri N., Schlimpert S., Flärdh K., Buttner M. J. GMP signaling and the regulation of developmental transitions in streptomycetes // *Nat Rev Microbiol*. 2015. Vol. 13. № 12. P. 749–760. doi:10.1038/nrmicro3546.

9. Chater K. F. Genetics of differentiation in *Streptomyces* // *Annu. Rev. Microbiol.* 1993. Vol. 47. P. 685–713.
10. Chater K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2006. Vol. 361. P. 761–768. doi: 10.1038/ismej.2006.36.
11. Chen C. W., Huang C. H., Lee H. H., Tsai H. H. et al. Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes // *Trends Genet.* 2002. Vol. 18. № 10. doi: 10.1016/s0168-9525(02)02752-x
12. Chen W., He F., Zhang X., Chen Z. et al. Chromosomal instability in *Streptomyces avermitilis*: major deletion in the central region and stable circularized chromosome // *BMC Microbiol.* 2010. Vol. 10. № 198. doi: 10.1186/1471-2180-10-198.
13. Chevrette M. G., Carlos-Shanley C., Louie K. B., Bowen B. P., Northen T. R., Currie C. R. Taxonomic and Metabolic Incongruence in the Ancient Genus *Streptomyces* // *Front Microbiol.* 2019. Vol. 10. P. 2170. doi: 10.3389/fmicb.2019.02170.
14. Choufa C., Gascht P., Leblond H., Gauthier A. et al. Conjugation mediates large-scale chromosomal transfer in *Streptomyces* driving diversification of antibiotic biosynthetic gene clusters // *Molecular Biology and Evolution.* 2024. Vol. 41. № 11. doi: 10.1093/molbev/msae236.
15. Choulet F., Aigle B., Gallois A., Mangenot S. et al. Evolution of the Terminal Regions of the *Streptomyces* Linear Chromosome // *Molecular Biology and Evolution.* 2006. Vol. 23. № 12. P. 2361–2369. doi: 10.1093/molbev/msl108.
16. Colizzi E. S., van Dijk B., Merks R. M. H., Rozen D. E., Vroomans R. M. A. Evolution of genome fragility enables microbial division of labor // *Mol. Syst. Biol.* 2023. Vol. 19. №3. doi: 10.15252/msb.202211353.
17. Gomez-Escribano J. P., Algora Gallardo L., Bozhüyük K. A. J. et al. Genome editing reveals that pSCL4 is required for chromosome linearity in *Streptomyces clavuligerus* // *Microbial Genomics.* 2021. Vol. 7. № 11. doi: 10.1099/mgen.0.000669.

18. Gubbens J., Janus M. M., Florea B. I., Overkleeft H. S., van Wezel G. P. Identification of glucose kinase-dependent and -independent pathways for carbon control of primary metabolism, development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by quantitative proteomics // *Mol Microbiol.* 2012. Vol. 86, № 6. P. 1490–1507. doi: 10.1111/mmi.12072.
19. Hodgson D. A. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria // *Adv Microb Physiol.* 2000. Vol. 42. P. 47–238. doi: 10.1016/s0065-2911(00)42003-5.
20. Hopwood D. A. Therapeutic treasures from the deep // *Nat. Chem. Biol.* 2007. Vol. 3. № 8. P. 457–458.
21. Hopwood D. A., Kieser T. Conjugative plasmids of *Streptomyces* // *Bacterial Conjugation* / ed. Clewell D. B. New York: Plenum Press. 1993. P. 293 – 311 .
22. Hug L. A., Baker B. J., Anantharaman K., Brown C. T. et al. A new view of the tree of life // *Nature Microbiology.* 2016. Vol. 1. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.48.
23. Hungund B. S., Honnangi S., Desai S. S., Badiger K., Tennalli G. B. Diversity and Classification of *Streptomyces* // In: Yaradoddi J. S., Kontro M. H., Ganachari S. V. *Actinobacteria: Ecology, Diversity, Classification and Extensive Applications.* Singapore: Springer. 2021. Vol. 1. P. 89–116. doi: 10.1007/978-981-16-3353-9.
24. Jakimowicz D., Chater K., Zakrzewska – Czerwińska J. The ParB protein of *Streptomyces coelicolor* A3(2) recognizes a cluster of parS sequences within the origin-proximal region of the linear chromosome // *Mol Microbiol.* 2002. Vol. 45. № 5. P. 1365–1377. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03102.x.
25. Koshla O., Lopatniuk M., Rokytsky I., Yushchuk O. et al. Properties of *Streptomyces albus* J1074 mutant deficient in tRNA^{Leu}_{UAA} gene bldA // *Archives of microbiology.* 2017. Vol. 199. №8. 1175–1183. doi: 10.1007/s00203-017-1389-7
26. Lechevalier H. A., Lechevalier M. P., Gerber N. N. Chemical composition as a criterion in the classification of actinomycetes // *Adv Appl Microbiol.* 1971. Vol. 14. P. 47–72. doi: 10.1016/s0065-2164(08)70539-2.

27. Leskiw B. K., Lawlor E. J., Fernandez-Abalos J. M., Chater K. F. TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Vol. 88. № 6. doi: 10.1073/pnas.88.6.2461
28. Leskiw B. K., Mah R., Lawlor E. J., Chater K. F. Accumulation of bldA-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *J Bacteriol*. 1993 Vol. 175. № 7. doi: 10.1128/jb.175.7.1995-2005.1993.
29. Lin Y. S., Chen C. W. Instability of artificially circularized chromosomes of *Streptomyces lividans* // *Mol Microbiol*. 1997. Vol. 26. № 4. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.5991975.x.
30. Liroy V. S., Lorenzi J.-N., Najah S., Poinsignon T. et al. Dynamics of the compartmentalized *Streptomyces* chromosome during metabolic differentiation // *Nature Communications*. 2021. Vol. 12. № 1. doi: 10.1038/s41467-021-25462-1.
31. Liu G., Chater K. F., Chandra G., Niu G. et al. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* // *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013. Vol. 77. № 1. P. 112–143. doi: 10.1128/MMBR.00054-12.
32. Lorenzi J.-N., Lespinet O., Leblond P. et al. Subtelomeres are fast-evolving regions of the *Streptomyces* linear chromosome // *Microbial Genomics*. 2021. Vol. 7. № 6. doi: 10.1099/mgen.0.000525.
33. Lorenzi J.-N., Thibessard A., Liroy V. S., Boccard F. et al. Ribosomal RNA operons define a central functional compartment in the *Streptomyces* chromosome // *Nucleic Acids Research*. 2022. Vol. 50. №20. P. 11654–11669. doi: 10.1093/nar/gkac1076
34. Maas R.-M., Gutz J., Wohlleben W., Muth G. The conjugative plasmid pSG5 from *Streptomyces ghanaensis* DSM 2932 differs in its transfer functions from other *Streptomyces* rolling-circle-type plasmids // *Microbiology*. 1998. Vol. 144. № 10. P. 2809–2817. doi: 10.1099/00221287-144-10-2809.
35. Manteca A., Sanchez J. *Streptomyces* development in colonies and soils // *Appl. Environ. Microbiol*. 2009. Vol. 75. № 9. P. 2920–2924.

36. Martín J. F., Liras P. Cascades and networks of regulatory genes that control antibiotic biosynthesis // *Subcell Biochem.* 2012. Vol. 64. P. 115–138. doi: 10.1007/978-94-007-5055-5_6.
37. Martín-Sánchez L., Singh K. S., Avalos M., van Wezel G. P. et al. Phylogenomic analyses and distribution of terpene synthases among *Streptomyces* // *Beilstein Journal of Organic Chemistry.* 2019. Vol. 15. P. 1181–1193. doi: 10.3762/bjoc.15.115.
38. McDonald B.R., Currie C.R. Lateral gene transfer dynamics in the ancient bacterial genus *Streptomyces* // *mBio.* 2017. Vol. 8. № 3. doi: 10.1128/mBio.00644-17.
39. Nikolaidis M., Hesketh A., Frangou N., Mossialos D. et al. A panoramic view of the genomic landscape of the genus *Streptomyces* // *Microbial Genomics.* 2023. Vol. 9. № 6. doi: 10.1099/mgen.0.001028.
40. Nouioui I., Carro L., García-López M., Meier-Kolthoff J. P. et al. Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria* // *Frontiers in Microbiology.* 2018. Vol. 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02007.
41. Park C. J., Andam C. P. Within-Species Genomic Variation and Variable Patterns of Recombination in the Tetracycline Producer *Streptomyces rimosus* // *Front. Microbiol.* 2019. Vol. 10. P. 552. doi: 10.3389/fmicb.2019.00552.
42. Polak E. H., Provasi J. Odor sensitivity to geosmin enantiomers // *Chem Senses.* 1992. Vol. 17. № 1. P. 23–26. doi: 10.1093/chemse/17.1.23.
43. Review article. Cell Regulation // *Curr. Opin. Microbiol.* 2024. Vol. 78. doi: 10.1016/j.mib.2024.102448.
44. Schniete J. K., Cruz-Morales P., Selem – Mojica N., Fernández – Martínez L. T., Hunter I. S., Barona – Gómez F., Hoskisson P. A. Expanding primary metabolism helps generate the metabolic robustness to facilitate antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* // *mBio.* 2018. Vol. 9. № 1. doi: 10.1128/mBio.02283-17.
45. Segata N., Börnigen D., Morgan X. C., Huttenhower C. PhyloPhlAn is a new method for improved phylogenetic and taxonomic placement of microbes // *Nature Communications.* 2013. Vol. 4. doi: 10.1038/ncomms3304.

46. Szafran M. J., Małecki T., Strzałka A., Pawlikiewicz K. et al. Spatial rearrangement of the *Streptomyces venezuelae* linear chromosome during sporogenic development // *Nat Commun.* 2021. Vol. 1. № 12. doi: 10.1038/s41467-021-25461-2
47. Te Poele E. M., Bolhuis H., Dijkhuizen L. Actinomycete integrative and conjugative elements. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2008, Vol. 94. № 1. P. 127 –143. doi: 10.1007/s10482-008-9255-x.
48. Thoma L., Muth G. The conjugative DNA-transfer apparatus of *Streptomyces* // *International Journal of Medical Microbiology*. 2015. Vol. 305. № 2. P. 224 –229.
49. Uchida T., Ishihara N., Zenitani H., Hiratsu K. et al. Circularized chromosome with a large palindromic structure in *Streptomyces griseus* mutants // *Journal of Bacteriology*. 2004. Vol. 186. № 11. P. 3313–3320. doi: 10.1128/JB.186.11.3313-3320.2004.
50. van Wezel G. P., McKenzie N. L., Nodwell J. R. Applying the genetics of secondary metabolism in model actinomycetes to the discovery of new antibiotics // *Methods Enzymol.* 2009. Vol. 458. P. 117–141.
51. Volff J.-N., Altenbuchner J. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome // *Molecular Microbiology*. 1998. Vol. 27. № 2. P. 239–246. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00652.x.
52. Waksman S. A., Henrici A. T. The nomenclature and classification of the Actinomycetes // *J Bacteriol.* 1943. Vol. 46. № 4. P. 337–341. doi: 10.1128/jb.46.4.337-341.1943.
53. Wang Y., Jiang Y. Chemotaxonomy of Actinobacteria // *InTech*. 2016. doi: 10.5772/61482.
54. Woese C.R., Kandler O., Bilic M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1990. Vol. 87. № 12. P. 4576–4579. doi: 10.1073/pnas.87.12.4576.

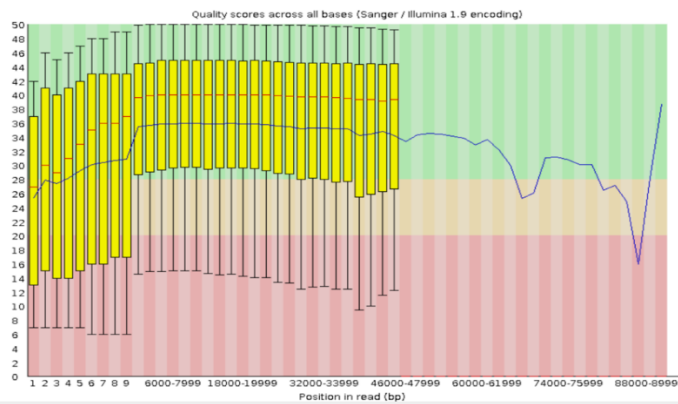
55. Wohlleben W., Pühler A. The *Streptomyces ghanaensis* low copy plasmid pSG2 and its use for vector construction // *Archives of Microbiology*. 1987. Vol. 148. № 3. P. 298–303.
56. Yang C. C., Sun W. C., Wang W. Y., Huang C. H. et al. Mutational analysis of the terminal protein Tpg of *Streptomyces* chromosomes: identification of the deoxynucleotidylation site // *PLoS One*. 2013. Vol. 8 № 2. doi: 10.1371/journal.pone.0056322.
57. Yang C. C., Tseng S. M., Pan H. Y, Huang C. H. et al. Telomere associated primase Tap repairs truncated telomeres of *Streptomyces* // *Nucleic Acids Res*. 2017. Vol. 2. № 45. doi: 10.1093/nar/gkx189.
58. Yang CC, Tseng SM, Chen CW. Telomere-associated proteins add deoxynucleotides to terminal proteins during replication of the telomeres of linear chromosomes and plasmids in *Streptomyces* // *Nucleic Acids Res*. 2015. Vol. 43. № 13. doi: 10.1093/nar/gkv302

Оцінка якості рідів за допомогою інструменту FastQC на веб – платформі Galaxy

Basic Statistics WT fastQC Report by GALAXY

Measure	Value
Filename	ONT_WT_trimmed_fastq_gz.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	155412
Total Bases	598.3 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	1000-90897
%GC	72

Per base sequence quality



Basic Statistics Var7 fastQC Report by GALAXY

Measure	Value
Filename	ONT_var2_trimmed_fastq_gz.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	162324
Total Bases	716.6 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	1000-128997
%GC	72

Per base sequence quality

