

**РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОВ ПОЛИКЕТИДСИНТАЗ (PKS)
В МЕТАГЕНОМНОМ СООБЩЕСТВЕ ПРЕСНОВОДНОЙ ГУБКИ
*Lubomirskia baicalensis***

© 2012 г. О. В. Калужная*, Н. В. Кулакова, В. Б. Ицкович

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033

Поступила в редакцию 26.03.2012 г.

Принята к печати 19.04.2012 г.

Проведен скрининг метагеномной ДНК микробного сообщества, ассоциированного с байкальской губкой *Lubomirskia baicalensis*, на наличие генов поликетидсинтаз (PKS). Ферментные системы PKS участвуют в синтезе большого числа биологически-активных веществ. При клонировании и секвенировании продуктов амплификации участка кетосинтазного (KS) домена генного кластера PKS найдено 15 фрагментов генов PKS, различающихся между собой по аминокислотным последовательностям на 35–65%. BLASTX-анализ показал, что все они принадлежат KS-доменам, обнаруженным в различных группах микроорганизмов alpha-, beta-, delta-Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Chlorophyta. Ряд последовательностей родственны генам, участвующим в биосинтезе метаболитов: курацина А (CurI, CurJ), стигмателлина (StiC, StiG), ностофицина (NpnB), криптофицина (CrpB). Гомология обнаруженных нами последовательностей с опубликованными в базе данных EMBL варьирует в пределах 50–82%, что свидетельствует о присутствии в сообществе пресноводной губки генов синтеза новых, еще не исследованных соединений поликетидной природы, которые могут иметь биотехнологический потенциал.

Ключевые слова: гены поликетидсинтаз (PKS), *Lubomirskia baicalensis*, сообщество микроорганизмов, метагеномная ДНК, филогенетический анализ.

DIVERSITY OF POLYKETIDE SYNTHASE GENES (PKS) IN METAGENOMIC COMMUNITY OF THE FRESHWATER SPONGE *Lubomirskia baicalensis*, by O. V. Kaluzhnaya*, N. V. Kulakova, V. B. Itskovich (Limnological Institute, Siberian Division, Russian Academy of Science, Irkutsk 664033; *e-mail: x-sun77@rambler.ru). Screening of metagenomic DNA of microbial community, associated with Baikalian sponge *Lubomirskia baicalensis*, was made to show the presence of polyketide synthase genes (PKS). PKS enzymatic systems take part in synthesis of a great number of biologically-active substances. Cloning and sequencing of amplified products of the ketosynthase domain section of PKS gene cluster has revealed 15 fragments of PKS genes differing from each other's on 35–65% by aminoacid sequences. BLASTX analysis has shown that all these sequences belong to the KS-domains identified in various groups of microorganisms: alpha-, beta-, delta-Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Chlorophyta. Some sequences were related to the genes which are taking part in biosynthesis of curacin A (CurI, CurJ), stigmatellin (StiC, StiG), nostophycin (NpnB), and cryptophycins (CrpB). The homology of the found sequences with those of the EMBL database varies within 50–82% confirming the presence in fresh-water sponge community the genes for synthesis of the new, yet not studied polyketide substances, possessing the biotechnological potential.

Keywords: genes of Polyketide Synthase (PKS), *Lubomirskia baicalensis*, community of microorganisms, metagenomic DNA, phylogenetic analysis.

Микроорганизмы природных сообществ являются важнейшим ресурсом новых антибиотиков и других биологически-активных метаболитов. К настоящему времени известно около 50000 различных биоактивных молекул микробного происхождения [1]. Однако лишь малая часть всех микроорганизмов (0.1–1%) может быть выделена

в виде культуры [2]. По этой причине именно некультивируемые микроорганизмы служат перспективным источником новых фармацевтических и биотехнологически значимых химических компонентов. Симбиотические сообщества, в особенности, сообщества губок (тип Porifera), многие годы активно исследуются в этом аспекте

Принятые сокращения: PKS (polyketide synthase) – поликетидсинтаза; KS (ketosynthase domain) – кетосинтазный (домен); БАВ – биологически-активные вещества; NRPS – нерибосомные пептидсинтазы.

* Эл. почта: x-sun77@rambler.ru

[3–9]. Будучи сидячими фильтраторами, губки формируют тесные ассоциации со множеством разнообразных микроорганизмов, таких как археи, гетеротрофные бактерии, цианобактерии, водоросли, динофлагелляты и грибы [10–12]. Бактерии составляют до 40% биомассы некоторых морских губок, а их систематическое разнообразие насчитывает 25 различных филумов (phylum) [13].

Большое число разнообразных по структуре вторичных метаболитов – поликетиды. В число фармацевтически важных поликетидов входят антибиотики грамицидин, эритромицин и тетрациклин, противоопухолевые агенты блеомицин и эпотиолон, иммуносупрессоры циклоспорин и рапамицин и другие [13]. Синтез поликетидов осуществляется мультиферментными комплексами, поликетидсинтазами (PKS, polyketide synthases). Это большое семейство мультифункциональных белков, использующих в качестве субстрата мономеры ацилкоэнзима А [14]. Различают три типа PKS, в зависимости от их структуры и механизма катализа. PKS типа I, или модульные PKS, состоят из нескольких функциональных участков (доменов), которые осуществляют пошаговый синтез поликетидов. Каждый модуль отвечает за один цикл элонгации цепи. PKS типа II – это комплексы нескольких моно- или бифункциональных ферментов, которые действуют итерационно в течение синтеза [2]. В таких системах каждый каталитический домен находится на отдельном белке; PKS типа II обычно участвуют в биосинтезе ароматических антибиотиков бактерий. PKS типа III – это гомодимерные ферменты, отвечающие за разнообразие флавоноидов и отличающиеся от первых двух типов тем, что используют в качестве субстрата малонилкоэнзим А [15, 16].

Часто синтез вторичных метаболитов происходит посредством комбинации ферментной системы PKS с аналогичной по структуре системой нерибосомных пептидсинтаз (NRPS). В результате образуются гибридные NRPS/PKS-комплексы, число и порядок модулей в которых определяет структурное разнообразие получающихся в результате пептидных или поликетидных продуктов, а множество вариантов сочетания модулей обуславливает разнообразие метаболитов с различной биологической активностью [17]. Актинобактерии, протеобактерии и цианобактерии, как правило, обладают ферментными системами первого типа [18]. Каждый модуль системы PKS I состоит, как минимум, из трех доменов: кетосинтазного (KS), ацилтрансферазного и ацил-переносящего. Поскольку последовательности модулей в PKS-системах соответствуют кластерам генов в геномах микроорганизмов, обнаружить способность сообществ микроорганизмов и их отдельных штаммов продуцировать биоактив-

ные компоненты можно с помощью ПЦР. Несмотря на многочисленные исследования биотехнологического потенциала микроорганизмов морских губок, пресноводные губки остаются в этом отношении совершенно не изученными. При этом известно, что бактериальные штаммы, полученные из необычных и неисследованных сообществ, часто являются продуктивным источником новых биологически-активных веществ (БАВ) [19].

Ранее нами показано, что микробное сообщество, ассоциированное с эндемичной губкой *L. baicalensis*, обитающей в оз. Байкал, отличается большим разнообразием и включает такие группы микроорганизмов, как Actinobacteria, α -, β -proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Nitrospirae [20]. Поскольку многие морские представители этих систематических групп известны как продуценты биоактивных метаболитов, закономерны попытки поиска и сравнительного анализа генов PKS в сообществе эндемичной губки Байкала.

В данной работе впервые показано разнообразие генов PKS в метагеномном сообществе пресноводной губки *L. baicalensis*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы губки собраны в ходе экспедиций в феврале 2009 г. в районе пос. Листвянка (юго-западное побережье оз. Байкал) с глубины 15 м. Образцы помещали в 70%-ный раствор этанола и хранили при 4°C. Суммарную ДНК выделяли с помощью набора “РибоСорб” (Россия) по методике производителя. Фрагменты KS-доменов генов PKS амплифицировали, используя выродненные олигонуклеотидные праймеры DKF (5'-GTGCCGGTNCRTGNGYYTC-3') и DKR (5'-GCCATGGAYCCNCARCARYG-3') [16] в следующем режиме: активация полимеразы (5 мин при 95°C); 35 циклов, включающих денатурацию ДНК (45 с при 95°C), отжиг праймеров (60 с при 62°C), элонгацию (90 с при 72°C и 10 мин при 72°C). ПЦР-фрагмент клонировали в векторе pTZ57R/T (“Fermentas”), после чего проводили трансформацию химически компетентных клеток *E. coli* XL1BL. Рекомбинантные клоны, содержащие вставку ожидаемого размера (около 700 п.н.), секвенировали на автоматическом секвенаторе SEQ 8800 (“Beckman Coulter Inc.”, США). Последовательности выравнивали и определяли процент их сходства при помощи модуля ClustalW программного пакета BioEdit 7.0 [21]. Для сравнения с опубликованными данными использовали программу BLASTX сервера NCBI [22]. Филогенетические деревья строили по методу объединения ближайших соседей (NJ, neighbor-joining method) пакета программ Mega 4 [23]. Нуклеотидные последовательности фрагментов

генов PKS депонированы в GenBank под номерами: JQ771596-JQ771610.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

PKS участвуют в синтезе большого числа биологически-активных метаболитов, продуцируемых микроорганизмами. Для поиска генов PKS в некультивируемом бактериальном сообществе пресноводной губки *L. baicalensis* использовали выведенные праймеры, специфичные к консервативным участкам KS-домена PKS [16]. Амплифицированный фрагмент длиной около 700 п.н. клонировали, после чего секвенировали вставки 85 случайно выбранных клонов. Нуклеотидные последовательности, гомологичные менее чем на 97%, рассматривали как уникальные. Всего обнаружено 15 отличающихся ампликонов, гомологичных между собой на 35–65%. Все они принадлежат к модульным PKS типа I. С помощью BLASTX-анализа проводили поиск ближайших гомологов и определяли процент сходства по аминокислотным последовательностям (таблица). Определенные нами последовательности гомологичны опубликованным на 50–82%, причем большинство (десять из пятнадцати последовательностей) – менее чем на 70%. Это свидетельствует о том, что в геномах микроорганизмов, ассоциированных с байкальской губкой, имеются новые, ранее не охарактеризованные, гены PKS. С целью классификации последовательностей по энзиматическим группам проводили филогенетический анализ. Для этого из банка данных EMBL извлекали последовательности модульных PKS типа I, проявляющие наибольшую гомологию с обнаруженными нами KS-доменами генов. В качестве внешней группы использовали PKS I нитчатого гриба *Gibberella moniformis*.

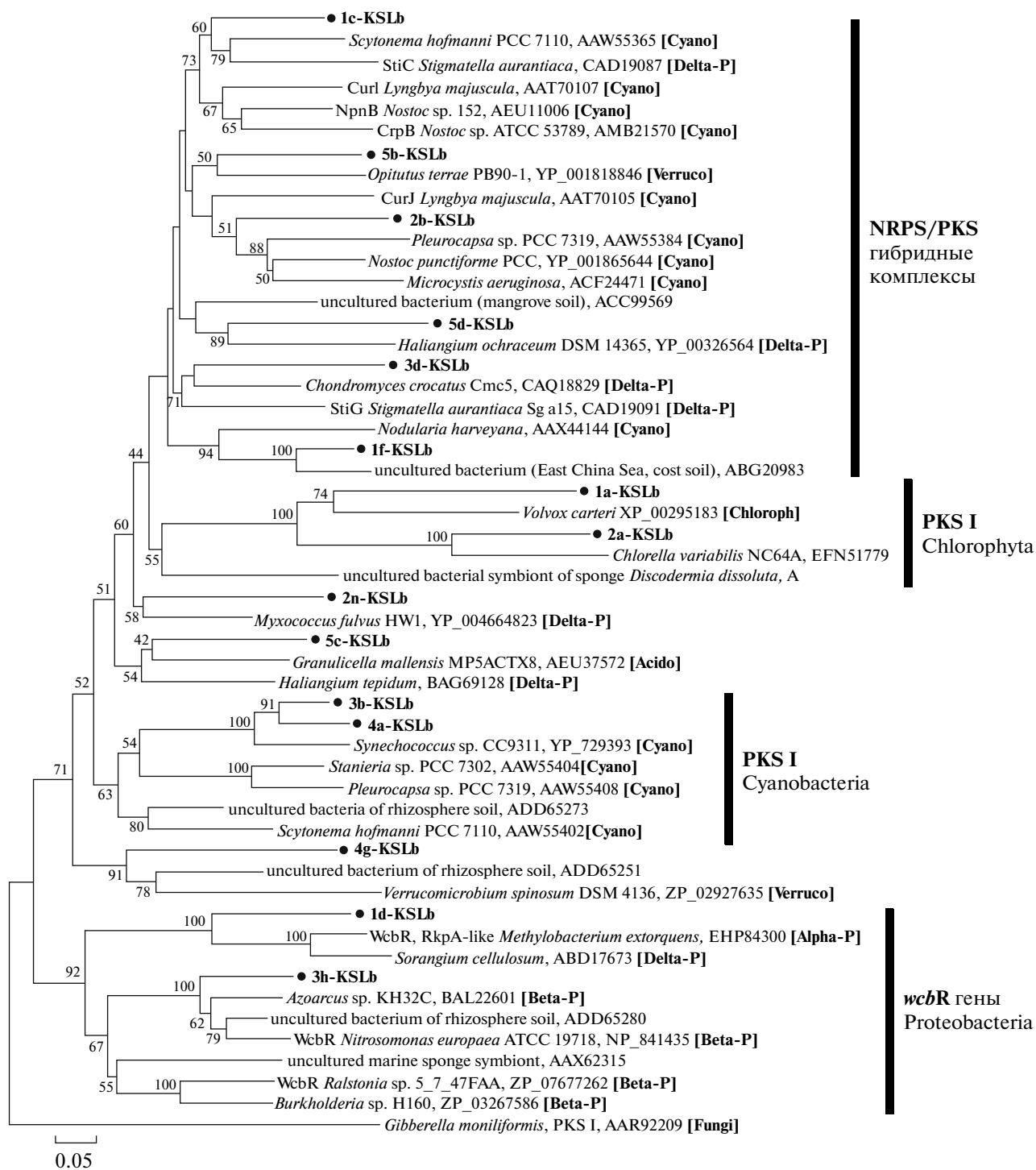
Установлено, что последовательности KS-доменов микробного сообщества *L. baicalensis* группируются вместе с известными PKS следующих бактериальных филумов: Proteobacteria (классы α -, β -, δ -Proteobacteria), Verrucoscomicrobia, Cyanobacteria и Acidobacteria, а также зелеными водорослями отдела Chlorophyta (рисунок).

Филогенетический анализ показал, что шесть из пятнадцати клонов (1a-KSLb, 1c-KSLb, 1f-KSLb, 2a-KSLb, 2b-KSLb, 3d-KSLb, 5b-KSLb) образуют отдельный кластер, объединяясь с последовательностями смешанных NRPS/PKS-комплексов. Известно, что именно гибридные системы NRPS/PKS, благодаря возможности комбинированного действия, обеспечивают биосинтез множества БАВ, в том числе, нашедших применение в промышленности (таких как рифампицин, миксотиазол, курацин, барбанид, ямайкамид и другие [14]). В подтверждение этому, среди последовательностей, филогенетически близких полученным KS-доменам, на древе присутствуют ге-

ны стигмателлина StiC и StiG, курацина CurI и CurJ, ностофицина NpnB, криптофицина CrpB (рисунок). Клоны, входящие в данный кластер, гомологичны между собой по аминокислотным последовательностям на 53–65%, на древе они объединяются с генами представителей различных бактериальных филумов (рисунок). Такой диапазон гомологии может свидетельствовать о функциональном разнообразии БАВ, в синтезе которых участвуют выявленные нами гены. Наиболее сходные последовательности из опубликованных в базе данных (GenBank) гомологичны выявленным нами на 61–82% (таблица).

Клон 1c-KSLb с высокой бутстреп-поддержкой объединяется с KS-доменом пресноводной цианобактерии *Scytonema hofmanni* PCC 7110, а также последовательностью гена стигмателлина (StiC, ингибитор электронного транспорта) почвенной миксобактерии *Stigmatella aurantiaca* [24]. В данной группе находятся также гены синтеза известных цианобактериальных метаболитов: противоопухолевого токсина курацина (CurI, *Lyngbya majuscula* [25], цитотоксина ностофицина [26] и деполимеризующего тубулин агента криптофицина [27]. Ближайшим гомологом последовательности 5b-KSLb является последовательность штамма *Opiritutus terrae* PB90-1, принадлежащего филуму Verrucoscomicrobia. Клон 2b-KSLb группируется с KS-доменами цианобактерий *Nostoc punctiforme* PCC 73102, *Pleurocapsa* sp. PCC 7319 и *Microcystis aeruginosa* NPCD-1, а также с геном синтеза курацина, CurJ, *Lyngbya majuscula*; клон 5d-KSLb – с миксобактерией *Haliangium ochraceum* DSM 14365; клон 1f-KSLb – с некультивируемой почвенной бактерией; клон 3d-KSLb – с представителями филума δ -Proteobacteria (*Chondromyces crocatus* и *Stigmatella aurantiaca*). Таким образом, в данном кластере преобладают последовательности представителей филума Cyanobacteria, а также порядка Muxobacteriales (класс δ -Proteobacteria, филлум Proteobacteria). Именно эти группы бактерий широко исследуются многие годы в связи с их способностью продуцировать биоактивные метаболиты [14, 28, 29]. Так, представители порядка Muxobacteriales наиболее часто после актиномицетов и грибов используются как продуценты антибиотиков [28]. Цианобактерии же, населяя как морские, так и пресноводные симбиотические сообщества губок [20, 30, 31], являются источником разнообразных токсинов [16].

Клоны 1a-KSLb и 2a-KSLb на древе кластеризуются с KS-доменами эукариотических зеленых водорослей (отдел Chlorophyta) – *Volvox carteri* и *Chlorella variabilis*. Между собой эти последовательности сходны лишь на 48%. При этом KS-домен 1a-KSLb гомологичен соответствующей последовательности *Volvox carteri* на 50%, а KS-домен 2a-KSLb – последовательности *Chlorella variabilis* на 64% (таблица). Примечательно, что в данную



Филогенетическое древо, построенное методом объединения ближайших соседей (NJ) на основе сравнения фрагментов аминокислотных последовательностей PKS бактериального сообщества *L. baicalensis* (240 аминокислотных остатков). Последовательности, определенные в данной работе, отмечены черными кружками, для опубликованных ранее приводятся номера доступа. Числа в узлах дерева соответствуют величинам бутстреп-поддержек. Масштаб эволюционных расстояний соответствует пяти заменам на каждые 100 п.н.

группу входит также последовательность KS-домена некультивируемого симбионта морской губки *Discodermia dissoluta*. Как показано ранее [32],

целый ряд микроорганизмов, ассоциированных с этой губкой, являются потенциальным источником разнообразных природных продуктов с цито-

Гомология изученных нами последовательностей KS-доменов с известными генами PKS

Клон (номер в GenBank)	Результат анализа BLAST	
	ближайшие гомологи (номер в GenBank)	Гомология, %
1a-KSLb (JQ771596)	<i>Volvox carteri</i> (XP_002951836)	50
1c-KSLb (JQ771597)	<i>Scytonema hofmanni</i> PCC7110 (AAW55365)	74
1d-KSLb (JQ771598)	<i>Methylobacterium extorquens</i> DSM 13060 (EHP84300)	66
1f-KSLb (JQ771599)	uncultured bacteria from East China Sea (ABG20983)	82
2a-KSLb (JQ771600)	<i>Chlorella variabilis</i> (EFN51779)	64
2b-KSLb (JQ771601)	<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7319 (AAW55384)	66
2n-KSLb (JQ771602)	<i>Myxococcus fulvus</i> HW-1 (YP_004664823)	68
3b-KSLb (JQ771603)	<i>Synechococcus</i> sp. CC9311 (YP_729393)	78
3d-KSLb (JQ771604)	<i>Chondromyces crocatus</i> (CAQ18829)	67
3h-KSLb (JQ771605)	<i>Azoarcus</i> sp. KH32C (BAL22601)	76
4a-KSLb (JQ771606)	<i>Synechococcus</i> sp. CC9311 (YP_729393)	77
4g-KSLb (JQ771607)	uncultured bacterium, soil sample (ADD65251)	64
5b-KSLb (JQ771608)	<i>Opitutus terrae</i> PB90-1 (YP_001818846)	66
5c-KSLb (JQ771609)	<i>Granulicella mallensis</i> MP5ACTX8 (YP_005058602)	67
5d-KSLb (JQ771610)	<i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365 (YP_003265646)	61

токсическим, антибактериальным, антигрибковым, антивирусными и другими биоактивными свойствами. Присутствие зеленых водорослей и доминирование видов рода *Chlorella* в сообществах байкальских губок показано в работе Ханда (Handa) и соавт. [33]. Авторы отмечали, что обилие в озере Байкал пресноводных губок, сосуществующих с хлорофилл-содержащими микроорганизмами, свидетельствует об их важной роли в процессах накопления первичной продукции в экосистеме озера [33]. Зеленые водоросли довольно широко распространены и в сообществах морских губок [7, 34], где они, как правило, присутствуют во внешнем слое тела губки [35]. По-видимому, в пресноводных сообществах эукариотические микроорганизмы также могут служить источниками различных БАВ.

С высокой степенью достоверности на древе формируется клада, в которую входят последовательности 1d-KSLb, 3h-KSLb, сходные между собой на 52%. Характерной особенностью данной клады является то, что она объединяет гены WcbR, участвующие в образовании слизистой бактериальной капсулы [36]. При этом все последовательности этой группы принадлежат к различным классам филума Proteobacteria (рисунок). Так, ближайшим гомологом последовательности 1d-KSLb является KS-домен α -Proteobacteria, метилотрофа *Methylobacterium extorquens* (66% сходства). В этой же группе находится последовательность, принадлежащая представителю δ -Proteobacteria (порядок Mucosoccales) — *Sorangium cellulosum*, продуценту противоопухолевых аген-

тов эпотиолонов [37]. Клон 3h-KSLb формирует группу родственных последовательностей, в которую входят β -Proteobacteria, а также KS-домены некультивируемой почвенной бактерии и некультивируемого симбионта губки. Наибольший процент сходства (76%) на уровне последовательностей аминокислот имеет KS-домен почвенной бактерии *Azoarcus* sp. KH32C. Виды этого рода известны как азотфиксирующие эндосимбионты растений, а также как бактерии, разлагающие различные ароматические соединения [38]. Наличие представителей α - и β -Proteobacteria в некультивируемом микробном сообществе *L. baicalensis* ранее показано нами при анализе разнообразия генов 16S рРНК, при этом общая доля микроорганизмов данных классов составляет 35% [20]. Представители δ -Proteobacteria не были обнаружены в нашей предыдущей работе, однако результаты настоящего исследования свидетельствуют о вероятности их присутствия в сообществе пресноводной губки.

Клоны 3b-KSLb и 4a-KSLb на древе объединяются с последовательностями PKS различных штаммов цианобактерий (рисунок). При этом наибольшую гомологию данные клоны проявляют между собой (84%) и с последовательностью KS-домена *Synechococcus* sp. CC9311 (78 и 77% соответственно) (таблица). Виды рода *Synechococcus* sp. доминируют в пикопланктоне оз. Байкал [39], а также присутствуют в метагеномном сообществе *L. baicalensis* [20], поэтому выявление генов PKS, принадлежащих данному роду, является вполне закономерным. В “цианобактериальную”

кладу входят также последовательности штаммов *Stanieria* sp. PCC 7302, *Pleurocapsa* sp. PCC 7319, *Scytonema hofmanni* PCC 7110 и KS-домен некультивируемой почвенной бактерии.

Клоны 2n-KSLb, 5c-KSLb, 4g-KSLb формируют на древе обособленные ветви, проявляя менее 70% сходства по аминокислотным последовательностям с ближайшими гомологами (таблица). Так, последовательность 2n-KSLb объединяется с KS-доменом морской миксобактерии *Muxococcus fulvus* HW-1. Штаммы данного вида содержат такие антибиотики, как миксотиазол [40] и миксоваларгин [41]. Соседнюю ветвь по отношению к клону 2n-KSLb формирует клон 5c-KSLb, что может свидетельствовать о филогенетической близости метаболитов, продуцируемых данными последовательностями. Ближайшим гомологом KS-домена 5c-KSLb является последовательность ацидобактерии (филум Acidobacteria) тундровых и сфагновых почв *Granulicella mallensis* MP5ACTX8 [42], а также морской миксобактерии *Haliangium tepidum* (порядок Muxobacteriales, класс δ -Proteobacteria, филлум Proteobacteria). Клон 4g-KSLb объединяется с KS-доменом штамма *Verrucomicrobium spinosum* DSM4136 (филлум Verrucomicrobia) и некультивируемой почвенной бактерией (рисунок). Представители филума Verrucomicrobia входят в состав пресноводных и морских сообществ, термальных источников, микробных сообществ почвы, некоторые известны как эндосимбионты простейших и нематод [43].

Результаты, полученные нами в данной работе, показывают, что в микробном сообществе пресноводной губки *L. baicalensis* имеются разнообразные гены PKS, принадлежащие микроорганизмам различных систематических групп. Следует отметить, что многие штаммы, выявленные в качестве гомологов и использованные в филогенетическом анализе, являются коллекционными штаммами, геномы которых расшифрованы и опубликованы. Вместе с тем, целый ряд филогенетически-близких последовательностей PKS принадлежат бактериям-продуцентам природных метаболитов, имеющим промышленное значение. Однако невысокая гомология с известными последовательностями не позволяет однозначно утверждать, что синтез подобных метаболитов осуществляется в сообществе байкальской губки. С другой стороны, этот факт может свидетельствовать о том, что в метагеномном сообществе *L. baicalensis* имеются новые гены PKS, принадлежащие еще не охарактеризованным микроорганизмам, а также о потенциальной способности сообщества губки к биосинтезу неизвестных пока биологически-активных веществ. Наши данные открывают перспективы дальнейших исследований в направлении поиска новых БАВ в бактериальных сообществах пресноводных губок.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-00323) и гранта Лаврентьевского фонда СО РАН (№ 6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raja A., Prabakarana P. 2011. Actinomycetes and drug-an overview. *Am. J. Drug. Disc. Devel.* **1**, 75–84.
2. Wawrik B., Kerkhof L., Zylstra G.J., Kukor J.J. 2005. Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2232–2238.
3. Kennedy J., Codling C.E., Jones B.V., Dobson A.D., Marchesi J.R. 2008. Diversity of microbes associated with the marine sponge, *Haliclona simulans*, isolated from Irish waters and identification of polyketide synthase genes from the sponge metagenome. *Environ. Microbiol.* **10**, 1888–1902.
4. Mohamed N.M., Rao V., Hamann M.T., Kelly M., Hill R.T. 2008. Monitoring bacterial diversity of the marine sponge *Ircinia strobilina* upon transfer into aquaculture. *Appl. Env. Microbiol.* **74**, 4133–4143.
5. Zhu P., Li Q., Wang G. 2008. Unique microbial signatures of the alien Hawaiian marine sponge *Suberites zeteki*. *Microb. Ecol.* **55**, 406–414.
6. Schneemann I., Nagel K., Kajahn I., Kajahn I., Labes A., Wiese J., Imhoff J.F. 2010. Comprehensive investigation of marine Actinobacteria associated with the sponge *Haliclondria panacea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3702–3714.
7. Sipkema D., Blanch H.W. 2010. Spatial distribution of bacteria associated with the marine sponge *Tethya californiana*. *Mar. Biol.* **157**, 627–638.
8. Sipkema D., Schippers K., Maalcke W.J., Yang Y., Salim S., Blanch H.W. 2011. Multiple approaches to enhance the cultivability of bacteria associated with the marine sponge *Haliclona (gellius)* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2130–2140.
9. Haber M., Carbone M., Mollo E., Gavagnin M., Ilan M. 2011. Chemical defense against predators and bacterial fouling in the Mediterranean sponges *Axinella polyoides* and *A. verrucosa*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **422**, 113–122.
10. Li C.-Q., Liu W.-C., Zhu P., Yang J.L., Cheng K.D. 2011. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Gelliodes carnosa* collected from the Hainan Island coastal waters of the South China sea. *Microb. Ecol.* **62**, 800–812.
11. Hentschel U., Usher K.M., Taylor M.W. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**, 167–177.
12. Taylor M.W., Radax R., Steger D., Wagner M. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 295–347.
13. Webster N.S., Taylor M.W. 2012. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Envir. Microbiol.* **14**, 335–346.
14. Ehrenreich I., Waterbury J., Webb E. 2005. Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. *Appl. Envir. Microb.* **71**, 7401–7413.

15. Staunton J., Wilkinson B. 2001. Combinatorial biosynthesis of polyketides and nonribosomal peptides. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 159–164.
16. Barrios-Llerena M.E., Burja A.M., Wright P.C. 2007. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 443–456.
17. Ansari M.Z., Yadav G., Gokhale R.S., Mohanty D. 2004. NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. *Nucleic. Acids Res.* **32**, 405–413.
18. Bode H.B., Müller R. 2005. The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **44**, 6828–6846.
19. Jenke-Kodama H., Dittmann E. 2009. Evolution of metabolic diversity: Insights from microbial polyketide synthases. *Phytochem.* **70**, 1858–1866.
20. Калужная О.В., Кривич А.А., Ицкович В.Б. 2012. Разнообразие генов 16S рРНК в метагеномном сообществе пресноводной губки *Lubomirskia bicalensis*. *Генетика.* **8**, 851–854.
21. Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp.* **41**, 95–98.
22. Altschul S.F., Warren G., Miller W. Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
23. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596–1599.
24. Gaitatzis N., Silakowski B., Kunze B., Nordsiek G., Blöcker H., Höfle G., Müller R. 2002. The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *J. Biol. Chem.* **277**, 13082–13090.
25. Chang Z., Sitachitta N., Rossi J.V., Roberts M.A., Flatt P.M., Jia J., Sherman D.H., Gerwick W.H. 2004. Biosynthetic pathway and gene cluster analysis of curacin A, an antitubulin natural product from the tropical marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.* **67**, 1356–1367.
26. Fewer D.P., Österholm J., Rouhiainen L., Jokela J., Wahlsten M., Sivonen K. 2011. Nostophycin biosynthesis is directed by a hybrid PKS-NRPS in the toxic cyanobacterium *Nostoc* sp. 152. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 8034–8040.
27. Magarvey N.A., Beck Z.Q., Golakoti T., Ding Y., Huber U., Hemscheidt T.K., Abelson D., Moore R.E., Sherman D.H. 2006. Biosynthetic characterization and chemoenzymatic assembly of the cryptophycins. Potent anticancer agents from cyanobionts. *ACS Chem. Biol.* **1**, 766–779.
28. Bode H.B., Müller R. 2006. Analysis of myxobacterial secondary metabolism goes molecular. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 577–588.
29. Wenzel S.C., Müller R. 2009. Myxobacteria – “microbial factories” for the production of bioactive secondary metabolites. *Mol. Biosyst.* **5**, 567–574.
30. Taylor M.W., Radax R., Steger D., Wagner M. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 295–347.
31. Gernert C., Glockner F.O., Krohne G., Hentschel U. 2005. Microbial diversity of the freshwater sponge *Spongilla lacustris*. *Microb. Ecol.* **50**, 206–212.
32. Schirmer A., Gadkari R., Reeves C., Ibrahim F., Edward F. DeLong E., Hutchinson R. 2005. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4840–4849.
33. Handa S., Nakahara M., Nakano T., Itskovich V. B., Masuda Y. 2001. Aerial algae from southwestern area of Lake Baikal. *Hikobia.* **13**, 463–472.
34. Brümmer F., Pfannkuchen M., Baltz A., Hauser T., Thiel V. Light inside sponges. 2008. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **367**, 61–64.
35. Trautman D.A., Hinde R. 2004. Sponge/algal symbioses: a diversity of associations. *Symbiosis.* **4**, 521–537.
36. Donadio S., Monciardini P., Sosio M. 2007. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 1073–1109.
37. Hardt I.H., Steinmetz H., Gerth K., Sasse F., Reichenbach H., Höfle G. 2001. New natural epothilones from *Sorangium cellulosum*, strains So ce90/B2 and So ce90/D13: isolation, structure elucidation, and SAR studies. *J. Nat. Prod.* **64**, 847–856.
38. Nishizawa T., Tago K., Oshima K., Hattori M., Ishii S., Otsuka S., Senoo K. 2012. Complete genome sequence of the denitrifying and N₂O-reducing bacterium *Azoarcus* sp. strain KH32C. *J. Bacteriol.* **194**, 1255.
39. Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Saphonova T.A., Tikhonova I.V. 2006. Autotrophic picoplankton of Lake Baikal: composition, abundance and structure. *Hydrobiol.* **568**, 9–17.