

БІОСИНТЕТИЧНИЙ ПОТЕЦІАЛ АКТИНОМІЦЕТІВ РИЗОСФЕРИ *HELIANTHEMUM STEVENII* RUPR. EX JUZ. & POZD.

С.І. Тістечок, Ю.Я. Мицик, В.О. Федоренко, О.М. Громико*

Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна

*Corresponding author: oleksandr.gromyko@lnu.edu.ua

Received 10 June 2019; Accepted 25 June 2019

Проблематика. Актуальними проблемами людства сьогодні є висока частота виникнення нових мультирезистентних форм патогенних мікроорганізмів, нестача продуктів харчування, а також забруднення навколишнього середовища, особливо агроєкосистем. Скринінг нових природних продуктів та впровадження їх у медицині, ветеринарії, сільському господарстві тощо є одним із підходів до вирішення цих проблем. Особливий інтерес викликають актиноміцети – рекордсмени за кількістю синтезованих біологічно активних сполук.

Мета. Метою роботи є оцінка біосинтетичних властивостей актиноміцетів ризосфери ендеміка Кримського півострова сонянки Стевена *Helianthemum stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd.

Методика реалізації. Зразки ризосфери *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. відбирали на південних схилах Нікітського хребта (Кримський півострів). Виділяли актиноміцети прямим посівом змивів ризосфери, обробкою коренів водним розчином фенолу або прожарюванням їх за 100 °С протягом 60 хв з подальшим висіванням на живильні середовища. Антибактерійні та протикандидозну активності вивчали через висівання культур актиноміцетів уколом на вівсяне середовище і заливання 0,7 %-ним агаром з певною тест-культурою. Антифунгальні властивості вивчали через викладання агарового блоку з 5-денною культурою гриба на чашки з 3-денними культурами актиноміцетів та подальшим інкубуванням протягом 4-х діб. За відношенням діаметра зон пригнічення росту тест-культур до діаметра колоній актиноміцетів визначали індекс активності (ІА). Фітостимульовальні та ферментативні властивості вивчали загальноприйнятими методами.

Результати. З ризосфери *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. виділено 107 штамів актиноміцетів. 23,2 % ізолятів пригнічували ріст одного і більше типових штамів мікроорганізмів, здатних спричинювати інфекції людини. 8,4 % штамів актиноміцетів були антагоністами *S. aureus*, ріст грамнегативних бактерій затримувало значно менше досліджуваних культур. ІА цих ізолятів не перевищував 3. 80,1 % ізолятів були антагоністами хоча б одного штаму фітопатогенних бактерій. ІА цих штамів становив 1,2–13,0. Антифунгальну активність виявляло 15,9 % ізолятів, а їх ІА не перевищував 3. 17,8 % штамів продукували індоліл-3-оцтову кислоту, 10,3 % – сидерофори, а 14,2 % солюбілізували сполуки фосфору. Значна частка штамів актиноміцетів продукували гідролітичні ферменти: амілази, ліпази, пектинази, протеази. 29,9 % ізолятів здатні деколоризувати Azure B, а також 8,4 % штамів актиноміцетів синтезували лакази.

Висновки. Оцінено здатність актиноміцетів ризосфери *Helianthemum stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd синтезувати антимікробні речовини, ферменти, а також сполуки, здатні сприяти росту і розвитку рослин. Виділено штами з широким спектром антимікробної дії, а також штами, які специфічно пригнічували ріст певного штаму патогенних мікроорганізмів. Для низки антагоністів фітопатогенної мікрофлори була притаманна фітостимульовальна дія. Виділено продуцентів гідролаз та оксидоредуктаз.

Ключові слова: актиноміцети; антагоністичні властивості; фітостимульовальні властивості; Кримський півострів; біосинтетичний потенціал.

Вступ

Висока частота спалахів інфекційних захворювань людини, які важко піддаються лікуванню наявними на сьогодні хімотерапевтичними препаратами, зумовлена постійним виникненням мультирезистентних штамів патогенних мікроорганізмів. Часто такі інфекції призводять до летальних наслідків. Зокрема, серед

деяких грамнегативних збудників, таких як *Acinetobacter baumannii*, описані штами, стійкі до всіх доступних на сьогодні антибіотиків [1]. Тому створення нових антимікробних препаратів не втрачає своєї актуальності. Ще однією актуальною проблемою людства є стрімке зростання чисельності населення Землі. Це зумовлює потребу в збільшенні виробництва продуктів харчування, зокрема в підвищенні врожай-

ності сільськогосподарських рослин та продуктивності тваринництва. Застосування синтетичних добрив, засобів захисту рослин, кормових добавок збільшило виробництво сільськогосподарської продукції. Вирішення окреслених проблем тісно пов'язане зі скринінгом нових природних продуктів, які можуть бути основою ефективних антимікробних препаратів, екологічно чистих засобів захисту сільськогосподарських угідь від фітопатогенів, біопрепаратів для покращення росту і розвитку рослин тощо. На сьогодні більше половини комерційних препаратів мають природне походження або розроблені на основі природних молекул [2–5]. Людство давно визнало мікроорганізми багатим джерелом природних сполук із широким спектром біологічної дії [6, 7]. Зокрема, бактерії порядку *Actinomycetales* – добре відомі продуценти широкого кола антибіотиків, ферментів, фітогормонів та інших біологічно активних сполук [4, 8, 9].

Здатність актиноміцетів до синтезу широкого спектра ферментів та фіторегуляторів є ефективним інструментом у покращенні екологічного стану агроєкосистем і підвищенні їх продуктивності [10]. Ці мікроорганізми є типовими представниками ризосфери та ендосфери рослин [9]. Взаємодії в системі “рослина–актинобактерії” зазвичай мають мутуалістичний характер. Природні продукти актиноміцетного походження прямо (фітогормони) чи опосередковано (антибіотики, ферменти, сидерофори тощо) сприяють росту і розвитку рослин, а також їх стійкості до фітопатогенів і несприятливих умов зовнішнього середовища.

Як видно з результатів геномного та метаболічного аналізу, потенціал актиноміцетів як продуцентів природних біоактивних речовин є навіть більшим, ніж очікувалося раніше [11]. Однак останніми роками спостерігається підвищення частоти повторного відкриття відомих сполук, тому скринінг нових біоактивних молекул стає дуже трудомістким процесом. Це обумовлює інтерес дослідників до екзотичних або малодосліджених біотопів, у яких з більшою імовірністю можна виділити продуцентів нових раніше не описаних речовин. Одним із таких біотопів є Кримський півострів, для якого характерний широкий спектр різних типів ґрунтів, велика кількість рідкісних та ендемічних рослин [12]. Це може сприяти великому біорізноманіттю ґрунтової мікрофлори. У попередніх дослідженнях ми виявили, що з ризосфери рослин Кримського півострова можна

виділити штами актиноміцетів із широким спектром антимікробної дії, а також штами, здатні продукувати фітостимулювальні молекули, ферменти тощо [13, 14]. Низка досліджених штамів, які населяють ризосферу деяких ендемічних рослин Криму, а також інтродуцентів Нікітського ботанічного саду, продукують нові біологічно активні сполуки [15–18]. Це обумовлює наш інтерес до продовження дослідження властивостей актиноміцетів, виділених на території Кримського півострова.

Метою цього повідомлення є оцінка біо-синтетичних властивостей актиноміцетів ризосфери ендеміка Кримського півострова сонянки Стевена *Helianthemum stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd.

Матеріали і методи

Зразки коренів рослин *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. відбирали на схилах Нікітського хребта (Кримський півострів) у 2010 р. Виділення актиноміцетів здійснювали трьома способами: I – наважку коренів 2 г поміщали в колби зі 100 мл стерильної водопровідної води і струшували на орбітальному шейкері протягом 15 хв; II – наважку коренів 2 г поміщали в колбу з 100 мл 1,5 %-ного водного розчину фенолу і струшували на шейкері 30 хв; III – наважку коренів 2 г прогрівали протягом 60 хв за 100 °С, далі як в (I). Отримані суспензії в об'ємі 1 мл переносили в стерильні мікропробірки, робили 10-кратні розведення і висівали розведення 10^{-2} – 10^{-5} на чашки Петрі з середовищами ISP3 [19], ISP4 [19], середовище з пропіонатом натрію [20], середовище з хітином [20], Гаузе 2 [19], НВА [21]. Для пригнічення росту інших бактерій, а також грибів у середовища додавали налідиксову кислоту (25 мкг/мл) і ністатин (50 мкг/мл). Інкубували протягом 24 діб за 28 °С. Колонії відбирали за характерним для актиноміцетів ростом і морфологією. Чисті культури ізолятів зберігали в середовищі TSB [22] з додаванням рівного об'єму 50 %-ного розчину гліцерину за –80 °С. Виділені штами актиноміцетів зберігаються в Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка.

Для вивчення здатності синтезувати біоактивні сполуки з антимікробними властивостями виділених ізолятів актиноміцетів використали типові штами грамположитивних (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), грамнегативних

бактерій (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883, *Proteus vulgaris* ATCC 29905), дріжджів (*Candida albicans* ATCC 885-653), фітопатогенних бактерій (*Pseudomonas syringae* IMB 8511, *P. fluorescens* IMB 8573, *P. savastanoi pv. phaseolicola* IMB 4012, *Pectobacterium carotovorum* IMB 8982, *Xantomonas campestris pv. campestris* IMB 8003, *Agrobacterium tumefaciens* IMB 8628, *Erwinia amylovora* Mi2), фітопатогенних грибів (*Fusarium oxysporum* IMB 54201, *Botrytis cinerea* IMB 2306, *Aspergillus niger* IMB 16706, *Alternaria alternata* DSM 1102). Бактерії вирощували на середовищі LA [22], гриби – на середовищі Сабуро [22]. Для вивчення антибактерійної активності актиноміцетів їх висівали уколком по 6 шт. по краю чашок Петрі з середовищем ВС (вівсяне борошно – 40 г, агар – 18 г, водопровідна вода – 1000 мл, рН 7,5). Колонії вирощували в термостаті за 28 °С протягом 7 діб. Після цього агарову пластину заливали 4 мл 0,7 %-ного LA, який містив 10^9 клітин/мл тест-культур, та інкубували ще добу за 37 °С. Антифунгальну активність щодо дріжджових грибів здійснювали таким самим чином, лише замість LA використовували середовище Сабуро та інкубування залитих тест-культурою колоній актиноміцетів проводили за 23 °С. В експериментах із тест-штамами міцеліальних фітопатогенних грибів штами актиноміцетів висівали, як було описано вище, інкубували за тих самих умов протягом 3 діб. Після цього по центру агарової пластини викладали блок (\varnothing 6 мм) з 5-денним газоном тест-культури гриба. Продовжували інкубування ще 4 доби за 23 °С. Після цього вимірювали діаметр колоній актиноміцетів та діаметр зон затримки росту тест-культур. За відношенням діаметра зон пригнічення до діаметра колоній визначали антимікробну активність досліджуваних ізолятів, яку позначали як індекс активності (ІА). Експерименти виконували в трьох повторах. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel.

Для виявлення здатності продукувати індоліл-3-оцтову кислоту (ІОК) ізоляти інокулювали в 10 мл середовища TSB і вирощували протягом 2 діб на качалці при 180 об/хв і температурі 28 °С. Одержані прекультури в об'ємі 2 мл висівали в 30 мл ферментаційного середовища SG із додаванням 0,2 %-ного триптофану [22] в 250 мл колбах Ерленмеєра та вирощували протягом 5 діб за тих самих умов. Від-

бирали 1 мл культуральної рідини та осаджували центрифугуванням протягом 2 хв при 12 тис. об/хв. Відбирали 0,1 мл надосадової рідини та додавали рівний об'єм реактиву Сальковського [23]. Суміш інкубували за кімнатної температури протягом 30 хв у темряві. За наявності ІОК суміш набувала рожевого кольору. Як контроль до 100 мкл реактиву Сальковського додавали 100 мкл ІОК (концентрація 0,1 %).

Для виявлення продуцентів сидерофорів ізоляти висівали уколком по 6 шт. на чашки Петрі з середовищем YEM, вирощували за 28 °С протягом 7 діб. На 7-му добу утворені колонії заливали 2 мл CAS-індикаторним розчином [24] та інкубували протягом 1 год за кімнатної температури. Колонії, які синтезували сидерофори, змінювали забарвлення середовища з блакитного на світло-жовтий, жовтий або фіолетовий колір.

Для детекції здатності солюбілізувати сполуки фосфору ізоляти висівали уколком по 6 шт. на чашки Петрі з середовищем Муромцева [25] та вирощували за 28 °С протягом 7 діб. Утворення зон просвітління навколо колоній вказувало на здатність солюбілізувати нерозчинні сполуки фосфору.

Здатність до синтезу амілаз, ліпаз, протеаз, пектиназ оцінювали методами, описаними в [26]. Продуцентів лаказ і деколоризаторів Azur В виявляли, як у [27, 28].

Результати

Із ризосфери рослин сонянки Стевена *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. виділено 107 ізолятів, які за морфологічними особливостями та мікроскопічним аналізом віднесені до актиноміцетів (табл. 1).

Оцінка здатності виділених штамів актиноміцетів синтезувати антибіотичні сполуки виявила, що 23,2 % ізолятів затримували ріст хоча б однієї тест-культури бактерій чи дріжджів (рис. 1). Ріст грампозитивної бактерії *S. aureus* затримувало 8,4 % ізолятів. Виявлено значно менше антагоністів грамнегативних бактерій. Зокрема, ріст *E. coli* затримувало 3,7 % штамів актиноміцетів, *P. aeruginosa* – 0,9 %, *K. pneumonia* і *P. vulgaris* – по 1,8 %. Антифунгальна активність проти *C. albicans* була властива 5,6 % ізолятів. ІА більшості оцінених штамів був не вище 3. Окремі культури актиноміцетів мали дещо вищий ІА (3-6) проти *S. aureus*, *K. pneumonia* і *P. vulgaris* (по 0,9 %).

80,1 % ізолятів були антагоністами не менше одного штаму фітопатогенних бактерій. Серед них найбільша кількість ізолятів (51,4 %) пригнічувала ріст *X. campestris* pv. *campestris* (рис. 2). Половина з них мали ІА не більше 3 і майже 10 % штамів – від 3 до 6. У той же час у 17,8 % ІА був вище 6, в окремих штамів – 10–13. Трохи менше актиноміцетів затримували ріст іншої грамнегативної палички – *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (36,4 %). Рівень ІА антагоністів цього фітопатогену не перевищував 6. Щодо інших видів фітопатогенних псевдомонад виявлено значно менше антагоністів. Наприклад,

ріст *P. syringae* затримувало лише 6,5 % ізолятів з ІА менше 3. Антагоністів *P. fluorescens* було ще менше (3,7 %), ІА більшості з них коливався між 3 і 6. Майже однакова кількість досліджених актиноміцетних ізолятів мали здатність затримувати ріст *E. amylovora* та *A. tumifaciens* – 13,0 і 12,1 % відповідно. ІА цих ізолятів коливався в межах від 1,5 до 6,0. Лише 1 антагоніст *A. tumifaciens* мав ІА 6,7. Також виявлено 6,5 % антагоністів *P. carotovorum*. ІА більшості з них був не вище 6, і лише в одного з цих антагоністів ІА був на рівні 7,0.

Таблиця 1: Кількість ізолятів, виділених із ризосфери *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. різними методами

Середовище	Метод обробки зразків		
	Прямий посів	Обробка фенолу	Прогрівання
HVA	27	10	0
ISP3	19	10	0
ISP4	12	1	0
З хітином	16	3	0
З пропіонатом натрію	9	0	0
Середовище Гаузе 2	0	0	0
УСЬОГО	83	24	0

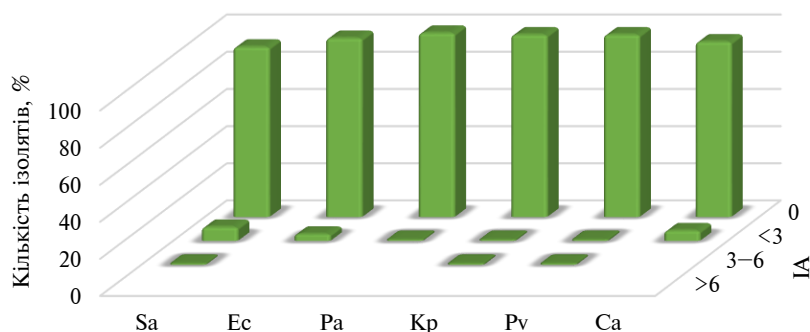


Рисунок 1: Антимікробна активність актиноміцетів ризосфери *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd.: Sa – *S. aureus*, Ec – *E. coli*, Pa – *P. aeruginosa*, Kp – *K. pneumonia*, Pv – *P. vulgaris*, Ca – *C. albicans*

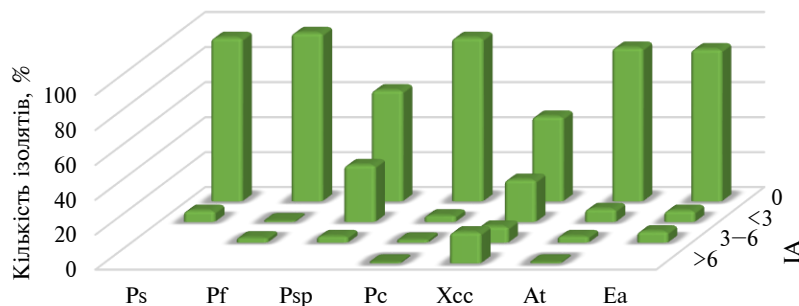


Рисунок 2: Антагоністичні властивості актиноміцетів ризосфери *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. проти фітопатогенних бактерій: Ps – *P. syringae*, Pf – *P. fluorescens*, Psp – *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, Pc – *P. carotovorum*, Xcc – *X. campestris* pv. *campestris*, At – *A. tumifaciens*, Ea – *E. amylovora*

Антифунгальну активність виявляло 15,9 % досліджених актиноміцетів (рис. 3). Найбільше було антагоністів *B. cinerea* (10,3 %). Затримувати ріст *F. oxysporum* чи *A. alternata* були здатні 6,5 і 7,5 % ізолятів відповідно, і лише 1 штамп був антагоністом *A. niger*. Їх ІА не перевищували 3.

Досліджено здатність виділених актиноміцетних ізолятів продукувати біоактивні молекули, які можуть сприяти росту і розвитку рослин. 17,8 % штамів продукували ІОК, 10,3 % – сидерофори, а 14,2 % солюбілізували сполуки фосфору (рис. 4).

Значна частка штамів актиноміцетів синтезували екзоферменти. Зокрема, найбільша частка ізолятів була здатна до продукції амілаз (66,4 %) і ліпаз (44,9 %). Трохи більше третини актиноміцетів виявляли протеолітичну активність, і 14,0 % – пектинолітичну. 29,9 % штамів актиноміцетів здатні деколоризувати Azure B, а також 8,4 % ізолятів були потенційними продуцентами лаказ (рис. 5).

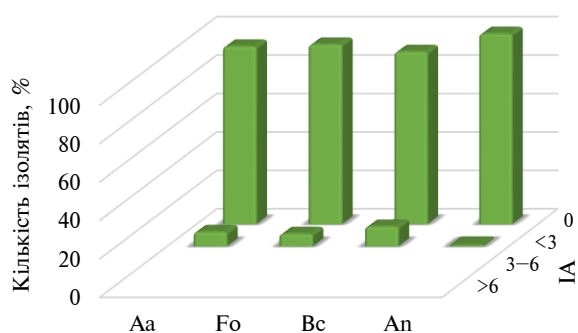


Рисунок 3: Антифунгальна активність актиноміцетів ризосфери *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd.: Aa – *A. alternata*, Fo – *F. oxysporum*, Bc – *B. cinerea*, An – *A. niger*

Обговорення

Комплексний підхід до вивчення біосинтетичних властивостей актиноміцетів, виділених із природних біотопів, дає можливість оцінити їхній біотехнологічний потенціал і зосередитися на перспективних культурах для метаболічного та геномного профілювання. Доведено, що рідкісні, ендемічні, лікарські рослини можуть бути багатим джерелом рідкісних і нових видів актиноміцетів, які своєю чергою здатні продукувати раніше не описані біологічно активні сполуки [29, 30]. У цій роботі ми дослідили біологічні властивості актиноміцетів, виділених із ризосфери ендемічної рослини Кримського півострова сонянки Стевена *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. Зокрема, ризосферні ізоляти продемонстрували антимікробні властивості щодо широкого кола типових штамів шпитальних інфекцій та фітопатогенних бактерій і грибів. Деякі штами актиноміцетів були антагоністами не більше однієї культури

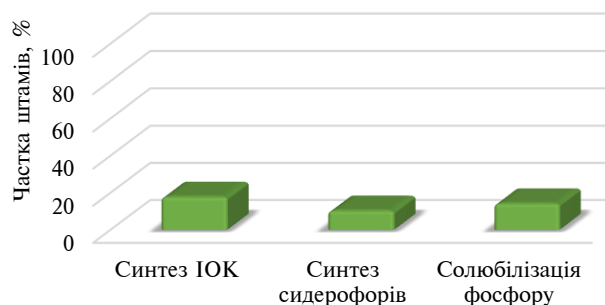


Рисунок 4: Здатність штамів актиноміцетів ризосфери *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. продукувати фітостимульвальні сполуки

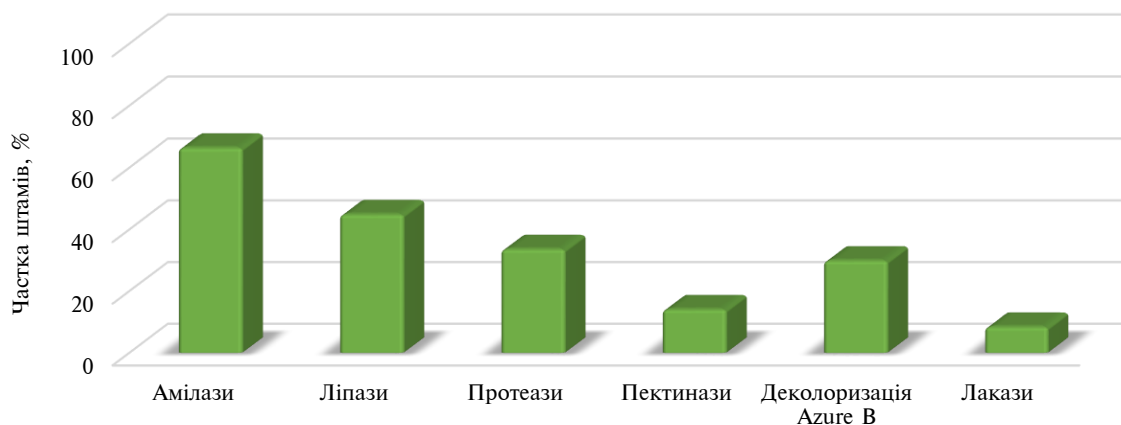


Рисунок 5: Здатність штамів актиноміцетів ризосфери *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. продукувати ферменти

бактерії чи гриба. Натомість виявлено й такі, що затримували ріст двох, трьох або більшості задіяних в експериментах тест-культур. Серед антагоністів типових штамів шпитальних інфекцій виявили шість ізолятів, які затримували ріст лише *S. aureus* (наприклад, штам 13-039), чотири ізоляти – лише *C. albicans* (наприклад, штам 13-020), а штам 13-198 пригнічував лише *E. coli* (табл. 2). Такі штами актиноміцетів, очевидно, продукують одну мажорну сполуку з антибактерійною чи фунгіцидною дією. В той же час штам 13-087 був антагоністом усіх використаних шпитальних грампозитивних і грамнегативних бактерій, але не затримував ріст дріжджів. Такий широкий спектр антимікробної дії може бути зумовлений синтезом низки різних за структурою сполук і, відповідно, з різним механізмом антибактерійної дії.

Досліджені ризосферні актиноміцети були представлені великою кількістю штамів з фітостимулювальними властивостями, у міжнародній літературі їх називають PGPR (Plant

growth promotion rhizobacteria). Сприяти росту рослин актиноміцети можуть різними прямими та опосередкованими механізмами. Це можуть бути антагоністичні властивості відносно фітопатогенної мікрофлори, що сприяє посиленню імунного статусу рослин. З іншого боку – це продукування фітогормонів, сидерофорів чи молекул, які можуть трансформувати нерозчинні форми елементів живлення [31]. Ризосфера *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. представлена досить великою кількістю актиноміцетів, яким притаманний один або кілька таких механізмів. Серед антагоністів фітопатогенів 25 штамів затримували ріст тільки *X. campestris* pv. *Campestris* (наприклад, штам 13-060 з IA 12,6), 8 штамів – *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (наприклад, штам 13-202), по 2 штами – *P. syringae* (наприклад, штам 13-032) і *B. cinerea* (наприклад, штам 13-027) (табл. 3). Лише один штам 13-088 пригнічував *A. tumefaciens*, так само як штам 13-075 – *E. amylovora* чи штам 13-142 – *F. oxysporum*. Штам 13-052 виявляв антибакте-

Таблиця 2: Індекс активності окремих штамів актиноміцетів ризосфери *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. проти типових шпитальних інфекцій

№ штамів актиноміцетів	Тест-культури*					
	Sa	Ec	Pa	Kp	Pv	Ca
13-039	2,6 ± 0,3	0	0	0	0	0
13-198	0	2,5 ± 0,3	0	0	0	0
13-020	0	0	0	0	0	1,8 ± 0,2
13-110	0	0	0	6,3 ± 0,9	6,0 ± 0,7	0
13-026	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0	0	0	1,4 ± 0,1
13-087	2,6 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,5 ± 0,3	1,5 ± 0,2	2,0 ± 0,2	0

Примітка. * – скорочення, як на рис. 1.

Таблиця 3: Антимікробна активність проти фітопатогенів та фітостимулювальні властивості окремих штамів актиноміцетів із ризосфери *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd.

№ штамів	Бактерії							Гриби				ФСВ		
	Ps*	Pf	Psp	Pc	Xcc	At	Ea	Aa	Fo	Vc	An	C	Φ	IOK
13-032	1,6 ± 0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	+
13-202	0	0	1,8 ± 0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	+	-	-
13-060	0	0	0	0	12,7 ± 1,1	0	0	0	0	0	0	-	-	+
13-088	0	0	0	0	0	1,4 ± 0,1	0	0	0	0	0	-	-	+
13-075	0	0	0	0	0	0	1,2 ± 0,1	0	0	0	0	-	-	+
13-142	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3 ± 0,1	0	0	-	-	-
13-027	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7 ± 0,2	0	-	+	-
13-1011	0	0	1,8 ± 0,2	0	13,0 ± 1,4	0	0	0	0	0	0	-	-	-
13-1018	0	0	2,4 ± 0,3	0	0	4,0 ± 0,6	0	0	0	0	0	+	-	-
13-1013	0	0	0	0	7,5 ± 0,7	0	0	0	0	1,4 ± 0,1	0	-	-	-
13-009	0	0	0	7,0 ± 0,8	6,8 ± 0,7	0	6,0 ± 0,7	0	0	0	0	+	+	-
13-052	1,5 ± 0,1	3,4 ± 0,3	3,3 ± 0,2	4,0 ± 0,3	4,4 ± 0,5	3,0 ± 0,3	3,4 ± 0,3	0	0	0	0	-	-	-
13-005	0	0	0	0	0	0	0	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0	1,2 ± 0,1	-	-	-
13-026	1,3 ± 0,1	0	2,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0	2,2 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,2 ± 0,2	0	+	-	+

Примітка. * – скорочення, як на рис. 2, 3; ФСВ – фітостимулювальні властивості; C – синтез сидерофорів; Φ – солюбілізація фосфору; IOK – індоліл-3-оцтова кислота.

рійну активність проти всіх використаних фітопатогенних бактерій, але не затримував ріст грибів, тоді як штам 13-005 був антагоністом більшості грибів, але не виявляв антибактерійних властивостей. Деякі штами актиноміцетів були антагоністами більшості з використаних фітопатогенів. Наприклад, штам 13-026 затримував ріст 8 з 11 тест-культур.

Деякі штами актиноміцетів, окрім продукування антимікробних сполук, виявляли здатність до синтезу фітостимулювальних молекул, а також широкий спектр ферментативних активностей. Наприклад, штам 13-009 був антагоністом деяких фітопатогенних бактерій та синтезував сидерофори і солюбілізував сполуки фосфору (див. табл. 3). Штам 13-026 мав широкий спектр антагоністичних властивостей і водночас продукував ІОК та сидерофори. Практично всі досліджені актиноміцети продукували ті чи інші гідролітичні ферменти. Серед штамів, здатних продукувати оксидоредуктази, 25 ізолятів (23,4 %) деколоризували Azure В, 3 ізоляти (2,8 %) були потенційними продуцентами лаказ, але не здатні деколоризувати Azure В, і 6 ізолятів виявляли обидві властивості одночасно. Актиноміцети ризосфери *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. виявили широкий спектр біологічних активностей. Очевидно, що у цих штамів відповідним чином експресуються гени біосинтезу різноманітних за структурою і механізмом дії природних продуктів. Метаболічне профілювання окремих штамів ризосфери *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. (див. табл. 1, 2) з високою імовірністю може виявити нові природні продукти.

References

- [1] Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2010;65(2):233-38. DOI: 10.1093/jac/dkp428
- [2] Bilyk O, Luzhetskyy A. Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria. Curr Opin Biotechnol. 2016;42:98-107. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.03.008
- [3] Hoffman T, Krug D, Bozkurt N, Duddela S, Jansen R, Garcia R, et al. Correlating chemical diversity with taxonomic distance for discovery of natural products in myxobacteria. Nat Commun. 2018;9(1):803. DOI: 10.1038/s41467-018-03184-1
- [4] Iqbal H, Low-Beinart L, Obiajulu J, Brady S. Natural product discovery through improved functional metagenomics in *Streptomyces*. J Am Chem Soc. 2016;138(30):9341-44. DOI: 10.1021/jacs.6b02921
- [5] Polanski J, Bogocz J, Tkocz A. Top 100 bestselling drugs represent an arena struggling for new FDA approvals: drug age as an efficiency indicator. Drug Discov Today. 2015;20(11):1300-4. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.06.015
- [6] Behie SW, Bonet B, Zacharia VM, McClung DJ, Traxler MF. Molecules to ecosystems: Actinomycete natural products *in situ*. Front Microbiol. 2016;7:2149. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02149
- [7] Kealey C, Creaven CA, Murphy CD, Brady CB. New approaches to antibiotic discovery. Biotechnol Lett. 2017;39(6):805-17. DOI: 10.1007/s10529-017-2311-8
- [8] Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim S-K. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. Microbiol Res. 2014;169:262-78. DOI: 10.1016/j.micres.2013.07.014

Висновки

Ризосферу *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. населяють актиноміцети з широким спектром біосинтетичних властивостей. Серед 107 ізолятів третина штамів синтезувала антимікробні сполуки, здатні затримувати ріст типових штамів бактерій і грибів, які можуть спричинювати інфекційні захворювання людини. 80,1 % досліджених актиноміцетів пригнічували ріст широкого кола фітопатогенних бактерій і грибів. Для низки антагоністів фітопатогенної мікрофлори була притаманна здатність до синтезу молекул, які сприяють росту і розвитку рослин. Поєднання таких властивостей є перспективним у створенні поліфункціональних біопрепаратів для сільського господарства. В дослідженій колекції актиноміцетів виділено продуцентів гідролаз. Виявлені продуценти лаказ можуть виступати деструкторами складних полімерів та бути задіяними як у тваринництві, так і в целюлозо-паперовій промисловості. Крім того, 32 штами, які здатні деколоризувати Azure В, є перспективними деструкторами відходів текстильної промисловості. Описані в цій роботі штами також є перспективними для геномного та метаболічного профілювання з метою скринінгу нових біологічно активних речовин.

Таким чином, вивчення ризосферної мікрофлори ендемічних рослин Кримського півострова дає можливість виділити штами актиноміцетів, які можуть продукувати широкий спектр біологічно активних молекул, зокрема антибіотиків, ферментів і фіторегуляторів.

- [9] Matsumoto A, Takahashi Y. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *J Antibiot (Tokyo)*. 2017;70(5):514-9. DOI: 10.1038/ja.2017.20
- [10] Bhatti AA, Haq S, Bhat RA. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microb Pathog*. 2017;111:458-67. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.09.036
- [11] Lewis K. New approaches to antimicrobial discovery. *Biochem Pharmacol*. 2017;15(134):87-98. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.11.002
- [12] Didukh YaP, Ed. *Biotopes of the Crimean Mountains*. Kyiv: NVP Interservis; 2016. 292 p.
- [13] Gromyko O. Antifungal and antibacterial properties of actinomycetes strains isolated from the rhizosphere of *Juniperus excelsa* Bieb. *Visnyk of Lviv Univ Biol Ser*. 2010;53:156-60.
- [14] Gromyko O. Antagonistic properties of actinomycetes from the ryzosphere of *Olea europaea* L. *Visnyk of Lviv Univ Biol Ser*. 2012;59:209-15.
- [15] Raju R, Gromyko O, Butsiak A, Fedorenko V, Luzhetskyy A, Müller R. Oleamycins A and B: new antibacterial cyclic hexadepsipeptides isolated from a terrestrial *Streptomyces* sp. *J Antibiotics*. 2014;67:339-43. DOI: 10.1038/ja.2014.1
- [16] Raju R, Gromyko O, Fedorenko V, Luzhetskyy A, Müller R. Oleaceran: A novel Spiro[isobenzofuran-1,2'-naphtho[1,8-bc]furan] isolated from a terrestrial *Streptomyces* sp. *Organic Lett*. 2013;15(14):3487-9. DOI: 10.1021/ol401490u
- [17] Raju R, Gromyko O, Fedorenko V, Luzhetskyy A, Plaza A, Müller R. Juniperolide A: A new polyketide isolated from a terrestrial actinomycete, *Streptomyces* sp. *Organic Lett*. 2012;14(23):5860-3. DOI: 10.1021/ol302766z
- [18] Raju R, Gromyko O, Fedorenko V, Herrmann J, Luzhetskyy A, Müller R. Rubimycinone A, a new anthraquinone from a terrestrial *Streptomyces* sp. *Tetrahedron Lett*. 2013;54(8):900-2. DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.11.130
- [19] Gauze GF, Preobrazhenskaya TP, Sveshnikova MA, Terehova LP, Maksimova TS. *Key to actinomycetes. Genus Streptomyces*. Moscow: Nauka; 1983. 245 p.
- [20] Zenova GM. *Soil actinomycetes*. Moscow; 1992. 79 p.
- [21] Zhang J. Improvement of an isolation medium for actinomycetes. *Modern App Sci*. 2011;5(2):124-7. DOI: 10.5539/mas.v5n2p124
- [22] Kieser T, Bibb M, Buttner M, Chater K, Hopwood D. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: John Innes Foundation; 2000. 634 p.
- [23] Sarwar M, Kremer RJ. Determination of bacterially derived auxins by a microplate method. *Lett Appl Microbiol*. 1995;20:282-5. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1995.tb00446.x
- [24] Verma V, Joshi K, Mazumdar B. Study of siderophore formation in nodule-forming bacterial species. *Res J Chem Sci*. 2012;2(11):26-9. DOI: 10.1007/s12088-016-0591-7
- [25] Muromtsev GS. Some methods for studying the dissolution of calcium phosphates by microorganisms. *Microbiologiya*. 1957;26:172-8.
- [26] Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EM, Sneath PH, Sackin MJ. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol*. 1983;129(6):1743-813. DOI: 10.1099/00221287-129-6-1743
- [27] Fernandes TAR, da Silveira WB, Passos FML, Zucchi TD. Characterization of a thermotolerant laccase produced by *Streptomyces* sp. SB086 *Ann Microbiol*. 2014;64:1363-9. DOI: 10.1007/s13213-013-0781-z
- [28] Li H, Zhang R, Tang L, Zhang J, Mao Z. Evaluation of *Bacillus* sp. MZS10 for decolorizing Azure B dye and its decolorization mechanism. *J Environ Sci (China)*. 2014;26(5):1125-34. DOI: 10.1016/S1001-0742(13)60540-9
- [29] Donate-Correa J, León-Barrios M, Pérez-Galdona R. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant Soil*. 2005;266:261-71. DOI: 10.1007/s11104-005-0754-5
- [30] Qin S, Li J, Chen HH, Zhao GZ, Zhu WY, Jiang CL, et al. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *App Environ Microbiol*. 2009;75(19):6176-86. DOI: 10.1128/AEM.01034-09
- [31] Sathya A, Vijayabharathi R, Gopalakrishnan S. Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech*. 2017;7(2):102. DOI: 10.1007/s13205-017-0736-3

С.И. Тистечок, Ю.Я. Мыцык, В.А. Федоренко, А.Н. Громыко

БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АКТИНОМИЦЕТОВ РИЗОСФЕРЫ *HELIANTHEMUM STEVENII* RUPR. EX JUZ. & POZD.

Проблематика. Актуальными проблемами человечества сегодня являются высокая частота возникновения новых мультирезистентных форм патогенных микроорганизмов, нехватка продуктов питания, а также загрязнение окружающей среды, особенно агроэкосистем. Скрининг новых природных соединений и внедрение их в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и других отраслях является одним из подходов к решению этих проблем. Особенный интерес вызывают актиномицеты – рекордсмены по количеству синтезируемых биологически активных соединений.

Цель. Цель работы состоит в оценке биосинтетических свойств актиномицетов ризосферы эндемика Крымского полуострова солнцезвезда Стевена *Helianthemum stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd.

Методика реализации. Образцы ризосферы *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. отбирали на южных склонах Никитского хребта (Крымский полуостров). Изолировали актиномицеты путем прямого посева смывов ризосферы, обработки корней водным раствором фенола или прогревания их при 100 °С на протяжении 60 мин с последующим посевом полученных суспензий на питательные среды. Антибактериальные и противокандидозные активности изучали путем посева культур актиномицетов уколом на овсяный агар и заливки 0,7 %-ным агаром с определенной тест-культурой. Антифунгальные свойства изучали путем выкладывания агарового блока с 5-дневной культурой гриба на чашки с 3-дневными культурами актиномицетов и последующим инкубированием на протяжении 4 суток. По отношению диаметра зон угнетения роста тест-культур к диаметру колоний актиномицетов определяли индекс активности (ИА). Фитостимулирующие и ферментативные свойства определяли общепринятыми методами.

Результаты. Из ризосферы *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. изолированы 107 штаммов актиномицетов. 23,2 % изолятов угнетали рост одного и более типичных штаммов микроорганизмов, способных вызывать инфекции человека. 8,4 % изолятов были антагонистами *S. aureus*, рост грамотрицательных бактерий задерживало существенно меньше штаммов актиномицетов. ИА этих изолятов не превышал 3. 80,1 % изолятов были антагонистами хотя бы одного штамма фитопатогенных бактерий. ИА этих штаммов составлял 1,2–13,0. Антифунгальную активность проявляли 15,9 % штаммов актиномицетов, а их ИА не превышал 3. 17,8 % изолятов продуцировали индолил-3-уксусную кислоту, 10,3 % – сидерофоры, а 14,2 % – солибилизировали соединения фосфора. Значительная часть штаммов актиномицетов продуцировала гидролитические ферменты: амилазы, липазы, целлюлазы, протеазы. 29,9 % изолятов деколоризировали Azure B, а также 8,4 % штаммов актиномицетов синтезировали лакказы.

Выводы. Оценена способность актиномицетов ризосферы *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd синтезировать противомикробные соединения, ферменты, а также молекулы, способные стимулировать рост и развитие растений. Изолированы штаммы актиномицетов с широким спектром антимикробного действия, а также штаммы, которые специфически угнетают рост определенного штамма патогенных микроорганизмов. Для ряда антагонистов фитопатогенной микрофлоры свойственно фитостимулирующее действие. Изолированы продуценты гидролаз и оксидоредуктаз.

Ключевые слова: актиномицеты; антагонистические свойства; фитостимулирующие свойства; Крымский полуостров; биосинтетический потенциал.

S.I. Tistechok, Y.Y. Mytsyk, V.O. Fedorenko, O.M. Gromyko

BIOSYNTHETIC POTENTIAL OF ACTINOMYCETES FROM *HELIANTHEMUM STEVENII* RUPR. EX JUZ. & POZD. RHIZOSPHERE

Background. Today the actual problems of humanity are the high frequency of the emergence of new multi-resistant pathogenic microorganisms, lack of food and pollution, especially agro-ecosystems. Screening of new natural products and introducing them in medicine, veterinary medicine, agriculture, etc. is one of the approaches to solving these problems. Objects of particular interest are actinomycetes – record holders in the production of biologically active compounds.

Objective. The purpose of the paper is evaluation of the biosynthetic properties of actinomycetes from the rhizosphere of the endemic *Helianthemum stevenii* Rupr. Ex Juz & Pozd. from Crimean peninsula.

Methods. Samples of the *H. stevenii* Rupr. Ex Juz & Pozd. rhizosphere were taken on the southern slopes of the Nikita Range (Crimean Peninsula). Actinomycetes were isolated by direct sowing of the washed rhizosphere, aqua solution of phenol treatment of the roots, or by heating them at 100 °C within 60 minutes and sowing on the nutrient medium. Antibacterial and anti-candidiasis activities were studied by culturing the actinomycetes strains by a prick on the oat medium and pouring the 0.7% agar with a certain test culture. Antifungal properties were studied by putting the agar block with a 5-day fungal culture on cups with 3-day cultures of actinomycetes and subsequent incubation for 4 days. An activity index (AI) was determined by the ratio of the diameter zone of the inhibit growth test-cultures to the diameter of the actinomycetes colonies. Phytostimulants and enzymatic properties were studied by commonly accepted methods.

Results. 107 actinomycetes strains from *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. rhizosphere were isolated. 23.2% of isolates inhibited growth of one or more typical microbial test cultures which are capable of causing a disease in humans. 8.4% of the actinomycetes strains were antagonists of *S. aureus*, the less actinomycetes strains inhibited gram-negative test cultures. AI of these strains was no more than 3. 80.1% of isolates were antagonists of at least one strain of the phytopathogenic bacteria. AI of these strains was no more than 3. Antifungal activity was in the 15.9% of isolates and their AI was no more than 3. 17.8 of actinomycetes strains were capable of producing indole-3-acetic acid, 10.3% – siderophores and 14.2% – phosphate solubilizers. A significant proportion of actinomycetes strains was capable of producing hydrolytic enzymes: amylases, lipases, pectinases and proteases. 29.9% of isolates can discolour Azure B and 8.4% are potentially laccase producers.

Conclusions. The ability of actinomycetes strains from *H. stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. rhizosphere to produce antimicrobial compounds, enzymes and plants growth promoting (PGP) compounds was evaluated. Actinomycetes strains with wide range and specific inhibit certain pathogenic strain were selected as well as strains that specifically inhibit the growth of a particular strain of pathogenic microorganisms. A number of phytopathogenic bacteria antagonists tend to phytostimulation. The producers of hydrolases and oxidoreductase were isolated.

Keywords: actinomycetes; antagonistic properties; phytostimulation; Crimean peninsula; biosynthetic potential.