

Л.А. Белявская¹, Т.А. Ефименко², О.В. Ефременкова²,
В.Е. Козырицкая¹, Г.А. Иутинская¹

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,

²Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе, ул. Большая Пироговская, 11, Москва, 119021, Россия

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЧВЕННОГО СТРЕПТОМИЦЕТА *STREPTOMYCES* SP. 100

Цель. Определить таксономическое положение почвенного стрептомицета *Streptomyces* sp. 100, изучить его антагонистические свойства по отношению к фитопатогенным и условно-патогенным микроорганизмам. **Методы.** Для идентификации штамма использовали общепринятые методы изучения морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств, а также осуществляли анализ 16S рРНК. Антагонистическую активность штамма изучали методом диффузии в агар. **Результаты.** Почвенный стрептомицет, идентифицированный как *Streptomyces netropsis* (Finlay et al, 1951) ИМВ Ас-5025 (УКМ Ас-2186), при выращивании на агаризированных средах ингибировал рост фитопатогенных бактерий (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 8609, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571, *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* 9030) и грибов (*Alternaria alternata* 16814, *Fusarium oxysporum* 54201); зоны задержки роста 20–32 и 16–30 мм соответственно. Установлено ингибирующее действие супернатанта культуральной жидкости и этанольного экстракта биомассы стрептомицета по отношению к фитопатогенным бактериям и грибам, из которых наиболее чувствительными оказались *Pseudomonas syringae* pv. *atropfaciens* 7886, *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* 102, *Alternaria alternata* 16814. Штамм не оказывал угнетающего действия на условно-патогенные микроорганизмы (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus pumilus* NCTC 8241, *Staphylococcus aureus* FDA 209P и др.). **Выводы.** Активный антагонизм *S. netropsis* ИМВ Ас-5025 по отношению к фитопатогенам позволяет рекомендовать его для применения в растениеводстве в качестве биологического средства защиты растений.

К л ю ч е в ы е с л о в а: стрептомицеты, идентификация, 16S рРНК, *Streptomyces netropsis*, фитопатогены, антагонистическая активность.

Бактериальные, грибковые и вирусные заболевания растений наносят значительный ущерб сельскохозяйственному производству. Несмотря на ежегодные затраты, направленные на борьбу с болезнями растений, в годы эпифитотий гибнет до 80 % урожая и ухудшается качество сельскохозяйственной продукции [1]. Перспективными для защиты растений от поражения фитопатогенными микроорганизмами являются микробные препараты на основе антагонистов фитопатогенов [2]. Избирательность действия, высокая активность по отношению к возбудителям заболеваний растений позволяют применять их в малых концентрациях и избегать накопления в урожае и внешней среде.

В настоящее время преобладающей стратегией защиты растений от фитопатогенов и вредителей является использование химических

ки синтезированных пестицидов, которые, наряду с положительным функциональным эффектом, обладают рядом недостатков, таких как отсутствие избирательного действия, вероятность подавления нецелевых организмов, персистентность, возникновение устойчивости к ним у возбудителей болезней и вредителей [3]. В связи с этим, перспективным элементом современных агротехнологий является использование препаратов на основе микроорганизмов или их метаболитов, которые проявляют фитозащитные и рострегулирующие свойства, повышают устойчивость растений к вредителям, заболеваниям и стрессовым факторам [4, 5, 6].

Среди актинобактерий активными продуцентами метаболитов для биоконтроля численности фитопатогенов являются представители рода *Streptomyces* [7, 8, 9, 10], синтезирующие вещества антибактериального, антигрибного и антипаразитарного действия. Кроме того, они продуцируют широкий спектр биологически активных веществ: аминокислот, ферментов, витаминов, фосфолипидов, стероидов, ненасыщенных жирных кислот, и других, большинство из которых характеризуются рострегулирующим действием [11, 12, 13, 14], а также являются индукторами устойчивости растений к фитопатогенам и неблагоприятным факторам окружающей среды [10, 12, 13]. Поэтому поиск активных антагонистов фитопатогенных микроорганизмов среди представителей рода *Streptomyces* является актуальным.

Ранее из южной каштановой почвы были выделены изоляты актинобактерий, предварительно отнесенные к роду *Streptomyces*, проявляющие антагонизм к некоторым фитопатогенам. В предыдущей работе [15], в результате скрининга выделено три изолята, которые проявляли высокий уровень антагонистической активности по отношению к фитопатогенным грибам *Alternaria alternata* 16814, *Fuzarium oxysporum* 54201 и *F. oxysporum* n 33. Указанные грибы являются возбудителями заболеваний пшеницы и томатов. Один из изолятов – *Streptomyces* sp. 100 проявил, кроме антагонистических, также и фитостимулирующие свойства, в частности, способствовал увеличению длины корешков и проростков семян яровой пшеницы.

Учитывая вышеизложенное, цель данной работы – определение таксономического положения *Streptomyces* sp. 100 и изучение его антагонистических свойств по отношению к широкому спектру фитопатогенных бактерий, грибов и условно-патогенных микроорганизмов.

Материалы и методы. Объектом исследований является выделенный из южной каштановой почвы штамм стрептомицета *Streptomyces* sp. 100 [15].

Исследуемый штамм поддерживали на агаризованных средах: картофельно-глюкозной (КГА), крахмало-аммиачной (КАА), овсяной (ISP-3) и Чапека (АЧ) [16].

Для изучения морфолого-культуральных особенностей, таких как форма цепочек спор, характер поверхности оболочки спор, цвет воздушного и субстратного мицелия, наличие растворимого пигмента, *Streptomyces* sp. 100 выращивали на сахарозо-нитратном агаре (АЧ), средах Гаузе-1 (Г-1), Гаузе-2 (Г-2), Ваксмана, КГА, КАА, СА, глюкозо-нитратном агаре (СР-1), желатиновом агаре (ЖА), дрожжево-солодовом агаре (ISP-2), ISP-3, мясопептонном агаре (МПА) в течение 7–14 суток при температуре 28 °С. Об-

разование штаммом меланоидного пигмента определяли на тирозиновом агаре (ISP-7) [16].

Форму цепочек спор изучали в световом микроскопе Meiji MT5300H, характер поверхности оболочки спор – в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol Ltd., Japan) [11].

Определение таких физиолого-биохимических характеристик, как отношение к кислороду, температуре, pH, NaCl, использование различных источников углерода, а также пептонизацию и коагуляцию молока, гидролиз крахмала, восстановление нитратов, образование сероводорода, деструкцию целлюлозы и др. проводили согласно [11, 16].

Чувствительность штамма к антибиотикам исследовали методом диффузии в агар с помощью стандартных дисков на КГА и АЧ [11, 16, 17]. В работе использовали диски с аминогликозидными (стрептомицин, неомицин, гентамицин, канамицин), макролидными (эритромицин, олеандомицин), бета-лактамами (бензилпенициллин, ампициллин, пенициллин, цефтазидим, цефепим), полимиксиновыми (полимиксин), ансамициновыми (рифампицин), тетрациклиновыми (тетрациклин), нитрофурановыми (фурадонин, фуразолидон), хинолоновыми (пемфлосацин, офлоксацин), полиеновыми (нистатин) антибиотиками, а также левомецетином.

Анализ гена 16S рРНК. Штамм рассевали на КГА, культивировали в течение 7–10 суток и отбирали отдельные колонии для выделения ДНК общепринятым методом [18]. ДНК выделяли с помощью коммерческого набора PowerSoil DNA Kit (MO BIO) по инструкции производителя. Колонию стрептомицета помещали в пробирку Bead Solution, содержащую лизирующий буфер (SDS) и стеклянные шарики, встряхивали на вортексе в течение 5 мин. Потом добавляли 60 мкл раствора С1 из набора и встряхивали на вортексе в течение 10 мин. Лизис осуществляли 15 мин при 65 °С в твердотельном термостате Термит (ДНК-технологии, Россия). Для удаления клеточного дебриса лизат центрифугировали на настольной центрифуге (10500 g, 5 мин). Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку, добавляли 250 мкл сорбента, далее все стадии обработки вели по инструкции фирмы-производителя. Выделенные нуклеиновые кислоты использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Аmplификацию генов 16S рРНК штамма проводили с коммерческим набором реагентов GenPak[®] qPCR Core, предназначенным для ПЦР-амплификации ДНК в режиме реального времени (ООО Лаборатория Изоген) с консервативными бактериальными праймерами [19]. Поскольку определение видовой принадлежности актинобактерий усложняется высоким содержанием ГЦ-пар, в работе использовали широкий набор консервативных праймеров (27f, 519r, 785f, 907r, 1100r, 1114f, 341f, 1492r) во избежание ошибки сиквенирования. Режимы проведения реакции: (1) 94 °С – 5 мин (2) 30 циклов с чередованием 94 °С – 1 мин, 51 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин, (3) 72 °С – 7 мин. Амплификацию проводили в термоциклере Бис (БИС-Н, Россия). Дальнейший анализ ампликонов и подготовку к сиквенсу вели по разработанным ранее методикам [19]. Анализ продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1 %-ном агарозном геле в 20 мМ трис-ацетатном буфере (pH 7,6). Фотографирование электрофореграмм осуществляли с помощью системы видеодокумента-

ции BioDocII (Biometra, Германия). Выделение продуктов ПЦР, соответствующих различным участкам гена 16S рРНК, проводили с использованием набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. Очистку продуктов ПЦР осуществляли методом спиртового переосаждения ДНК в мягких условиях (0,125 М ацетата аммония в 70 % этаноле). Водную фазу, содержащую ампликоны, переносили в новые пробирки и использовали для сиквенса [19].

Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом сиквенаторе 3500 Genetic Analyzer. Полученные последовательности гена 16S рРНК сравнивали с имеющимися в базе данных GenBank с помощью компьютерной программы Ribosomal Database Project, используя программный пакет BLAST. Родственные микроорганизмы определяли, вычисляя попарное сходство (%), основанное на соотношении количества совпадающих/проанализированных нуклеотидов гена 16S рРНК штамма со сравниваемыми бактериями. Филогенетическое положение определяли построением дендрограмм, показывающих положение изучаемого штамма среди близкородственных и типовых видов (программы ClustalX 2.1, Mega v. 6.00). Дерево строили (программа ClustalX 2.1) по методу сравнения ближайших соседей с бутстреп анализом (bootstrap Neighbor-Joining method tree) [20].

Для изучения антагонистических свойств, штамм стрептомицета выращивали поверхностно на агаризованных средах (КГА, КАА, ISP-3 и АЧ), а также глубинным культивированием в жидкой соевой среде [21].

При глубинном культивировании в качестве инокулята использовали культуру *Streptomyces* sp. 100 в экспоненциальной фазе роста, выращенную на соевой среде. Количество посевного материала составляло 5 % от объёма засеваемой среды. Культивирование проводили в колбах объёмом 750 мл со 100 мл среды на роторных качалках ($t^{\circ} = +28^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$; $n = 240$ об/мин) до стационарной фазы роста. Биомассу стрептомицета отделяли центрифугированием (4000 g) в течение 20 мин. Супернатант культуральной жидкости хранили при $+4^{\circ} \text{C}$. Для получения этанольного экстракта к осажденной биомассе добавляли 10 мл охлажденной до $+4^{\circ} \text{C}$ дистиллированной воды, тщательно перемешивали и центрифугировали еще 10 мин при 4000 g. Отмывание проводили 3–4 раза. Затем к биомассе добавляли 5 мл этанола и при периодическом перемешивании проводили экстракцию при комнатной температуре в течение 24 часов, отделяли биомассу центрифугированием (10 мин, 4000 g). Полученный этанольный экстракт хранили при $+4^{\circ} \text{C}$. Супернатант культуральной жидкости и этанольный экстракт биомассы использовали для изучения их антагонистической активности, которую определяли методом диффузии в агар по диаметрам зон задержки роста тест-культур вокруг блоков, лунок или дисков [1, 17].

В работе использовали следующие тест-культуры фитопатогенных бактерий-возбудителей заболеваний культурных растений: сои – *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycines* 8541 (УКМ В-1019), *P. savastanoi* pv. *glycines* 8571, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 8609, *X. axonopodis* pv. *glycines* 9075 (УКМ В-1162); бобовых – *Pantoea agglomerans* 8490; пшеницы – *P. syringae* pv. *atrafaciens* 912, *P. syringae* pv. *atrafaciens* 7886 (УКМ В-1016), *P. syringae* pv. *atrafaciens* 8291 (УКМ В-1015), *P. syringae*

рв. *atrofaciens* 9129 (УКМ В-1 154), *X. translucens* 7696; овса – *P. syringae* рв. *coronafaciens* 9030, *P. syringae* рв. *coronafaciens* 9060; овощных (картофель, томаты, перец) – *P. corrugata* 9070, *X. vesicatoriae* 7790, *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* 102; сирени – *P. syringae* 8511 (УКМ В-1027^Т). Фитопатогенные бактерии из коллекции отдела фитопатогенных бактерий ИМВ НАН Украины выращивали на картофельном агаре (КА) [22]. В качестве тест-культур фитопатогенных грибов использовали: возбудителей заболеваний плодов томатов – *Alternaria alternata* 16814, *A. culmorum* 00790, *Fusarium oxysporum* 54201; пшеницы – *F. tricinctum* 00795, *F. oxysporum* п.33 (в том числе гороха), *Cladosporium herbarum* 16863, *Cochliobolus spicifas* 16860; кукурузы – *Nigrospora oryzae* 16864. Фитопатогенные грибы из коллекции отдела физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАН Украины выращивали на СА [22].

В качестве референтных условно-патогенных для человека микроорганизмов использовали штаммы Всероссийской коллекции патогенных микроорганизмов (ВКПМ): грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. pumilus* NCTC 8241, *B. mycoides* 537, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *S. aureus* ИНА 00761 (MRSA – meticillin-resistant); грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и грибы – *Aspergillus niger* ИНА 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259. Референтные штаммы выращивали на мясо-пептонном агаре (МПА) [16].

Опыты проводили в четырехкратной повторности. Расчеты и статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью компьютерных программ *Statistica 6.0* и *Microsoft Excel '10*.

Результаты и обсуждение. Первым этапом наших исследований было определение таксономического положения *Streptomyces* sp. 100. Изучение морфолого-культуральных свойств показало, что штамм формирует колонии до 5 мм в диаметре с неровными краями, выпуклые с вдавленным центром; спороносы прямые, короткие, собраны в мутовки; споры овальные, оболочка спор гладкая (рис. 1). Эти признаки являются генетически закреплёнными и стабильными [23, 24, 25].

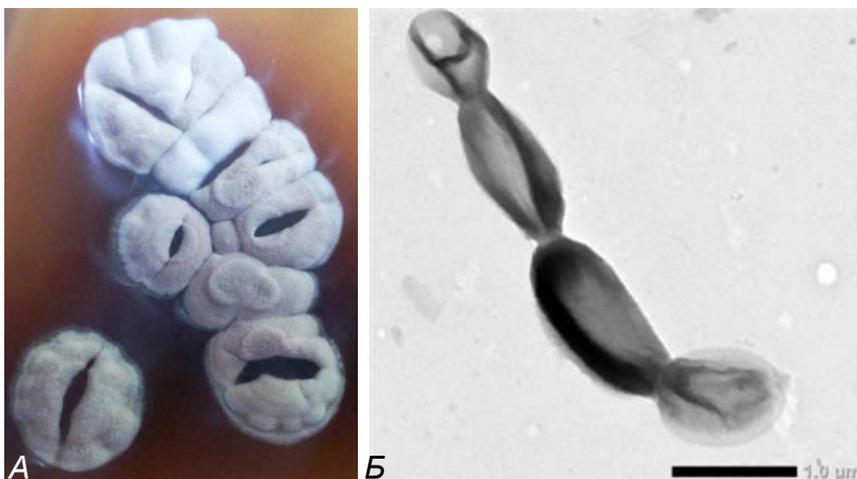


Рис. 1. Морфологические особенности *Streptomyces* sp. 100:
А - колонии на КА, Б - споры (электронная микроскопия ×6000)

При выращивании на агаризованных средах *Streptomyces* sp. 100 образует: воздушный мицелий – белый (АЧ, Г-2, КАА, СА, ЖА, ISP-7), бело-желтый, бело-серый (КГА), бело-коричневый, бело-сиреневый (СР-1, ISP-3, МПА); при росте на других средах (Г-1, ISP-2) стрептомицет его не образует; субстратный мицелий – желто-коричневый, желто-сиреневый (Г-1, КГА, ЖА, ISP-3, КАА, МПА), кремово-желтый, кремово-карминовый (АЧ, СА, ISP-7), желто-бурый, буро-коричневый (Г-2, СР-1), песочный (ISP-2); растворимый пигмент – желтый и желто-бурый (Г-1, СР-1, КГА, ISP-3, ISP-2, МПА), меланоидный пигмент не образуется.

Изучение физиолого-биохимических свойств *Streptomyces* sp. 100 показало, что штамм хорошо усваивает глюкозу, рамнозу, раффинозу, сахарозу, маннит, инозит, сорбит, но слабо растет на арабинозе, ксилозе, фруктозе, мальтозе, лактозе, целлобиозе и целлюлозе.

Streptomyces sp. 100 не разжижает желатин, не коагулирует и не пептонизирует молоко, не разрушает клетчатку, но гидролизует крахмал, восстанавливает нитраты до аммиака, образует сероводород.

Установлено, что штамм весьма чувствителен к аминогликозидным антибиотикам, а именно: неомицину, канамицину и стрептомицину (зоны ингибирования роста 26–46 мм), а также эритромицину, полимиксину, рифампицину, офлоксацину, пefлоксацину; при этом оказался нечувствительным к нистатину, азитромицину, ампициллину, цефтазидиму, фурадонину.

Исследуемый штамм хорошо растет на среде с повышенным (10–15 %) содержанием NaCl. При добавлении в оптимальную среду этилового спирта (1,5 %) рост отсутствовал. Оптимальными для роста штамма являются температура +28 °С, pH 6,8–7,5 и микроаэрофильные условия. Штаммовой особенностью *Streptomyces* sp. 100 является изменение цвета колоний на более темный при попадании света после роста в термостате.

На основании полученных характеристик с помощью компьютерной программы StmID [16], которая учитывает 125 признаков морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств, исследуемый штамм был идентифицирован как *S. marinolimosus* (ZoBell et Upham, 1944, Waksman, 1961) [26] секции Roseus, серии Fradiae (85 % гомологии).

За последние годы систематическое положение многих видов стрептомицетов пересмотрено и в настоящее время в определителе Берджи [27] нет вида *S. marinolimosus*. Поэтому было целесообразно уточнить таксономическое положение продуцента с использованием молекулярно-генетических методов.

Проведенный молекулярно-генетический анализ последовательностей гена 16S рРНК (1024 п.н.) исследуемого штамма *Streptomyces* sp. 100 и сравнение с базой данных GenBank показали 99 % идентичности со следующими видами стрептомицетов: *S. netropsis* DSM 40093 (GU383218.1), *S. netropsis* NRRL 2268 (NR_115460.1) и *S. syringium* LMG 20320 (NR_114931.1). Штамм *Streptomyces* sp. 100 входит в один кластер с указанными двумя видами: *S. netropsis* и *S. syringium* (рис. 2). Поскольку, согласно литературным данным [27], название вида *S. syringium* является синонимом *S. netropsis*, можно с высокой долей вероятности говорить о принадлежности исследуемого штамма к виду *S. netropsis*.

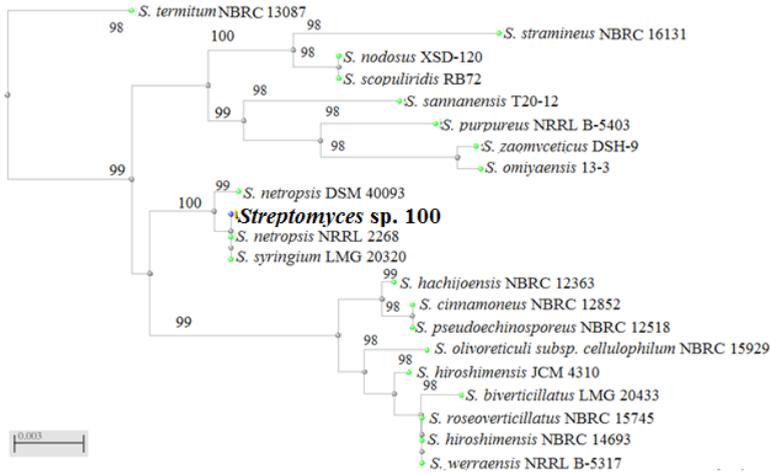


Рис. 2. Филогенетическое положение штамма *Streptomyces* sp. 100 в пределах рода *Streptomyces* на основе анализа 16S рНК

Таким образом, с помощью молекулярно-генетических исследований мы уточнили таксономическое положение стрептомицета: царство *Bacteria*, тип *Actinobacteria*, класс *Actinobacteria*, порядок *Streptomycetales*, семейство *Streptomycetaceae*, род *Streptomyces*, вид *S. netropsis*. Исследуемый штамм внесен в Депозиторий непатогенных микроорганизмов Украины как *S. netropsis* ИМВ Ас-5025 (УКМ Ас-2186 в Украинской коллекции микроорганизмов).

По литературным данным, штаммы *S. netropsis* характеризуются высокой антагонистической активностью. Так, *S. netropsis* SD-07 синтезирует полиеновый макролидный антибиотик с высокой антифунгальной активностью [28], а *S. netropsis* AN110065 проявляет антагонизм в отношении паразитических нематод растений [29].

Изучение антагонистических свойств *S. netropsis* ИМВ Ас-5025, выращенного на агаризованных питательных средах ISP-3 и агаре Чапека, показало, что штамм угнетал рост как фитопатогенных бактерий, так и грибов-возбудителей заболеваний зерновых, бобовых и овощных культурных растений (табл. 1).

**Таблица 1
Антагонистическая активность *S. netropsis* ИМВ Ас-5025**

| Фитопатогены | Зоны задержки роста фитопатогена (мм), на средах | |
|---|--|-------------|
| | ISP-3 | Агар Чапека |
| Фитопатогенные бактерии | | |
| <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> 8609 | 20±1,1 | 29±1,2 |
| <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 8571 | 21±1,5 | 31±1,5 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> 9030 | 24±1,4 | 32±1,7 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atropfaciens</i> 912 | 0 | 0 |
| Фитопатогенные грибы | | |
| <i>Alternaria alternata</i> 16814 | 30±1,4 | 21±1,3 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> 54201 | 15,5±0,7 | 19,5±0,9 |

Стрептомицет проявлял высокую антибактериальную активность по отношению к *X. axonopodis* pv. *glycines* 8609, *P. savastanoi* pv. *glycines* 8571, *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9030. Зоны ингибирования роста составляли 20–32 мм, в зависимости от среды выращивания. Не выявлено антагонизма к *P. syringae* pv. *atrofaciens* 912.

S. netropsis ИМВ Ас-5025 проявлял также антифунгальную активность по отношению к фитопатогенным грибам *A. alternata* 16814 и *F. oxysporum* 54201 – зоны ингибирования роста колеблются в пределах 21–30 и 15,5–19,5 мм соответственно.

Учитывая, что продуценты биологически активных веществ в промышленных условиях выращиваются в жидких питательных средах, были проверены антагонистические свойства супернатанта культуральной жидкости и этанольного экстракта биомассы продуцента к широкому спектру фитопатогенов при выращивании в соевой среде (табл. 2).

Таблица 2

Антагонистическая активность супернатанта культуральной жидкости и этанольного экстракта биомассы *S. netropsis* ИМВ Ас-5025

| Фитопатогены | Зоны задержки роста фитопатогена, мм | |
|--|--------------------------------------|-------------------------------------|
| | Супернатант культуральной жидкости | Экстракт биомассы (разведение 1:10) |
| Фитопатогенные бактерии | | |
| 1. <i>P. syringae</i> 8511 | 12±1,1 | 0 |
| 2. <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 8291 | 0 | 0 |
| 3. <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 7886 | 42±2,2 | 26±1,7 |
| 4. <i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> 9129 | 28±1,8 | 22±1,5 |
| 5. <i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> 9060 | 0 | 34±1,9 |
| 6. <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 8571 | 16±1,3 | 16±1,4 |
| 7. <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 8541 | 26±1,7 | 14±1,2 |
| 8. <i>P. corrugata</i> 9070 | 0 | 18±1,4 |
| 9. <i>X. visicatoriae</i> 7790 | 0 | 0 |
| 10. <i>X. translucens</i> 7696 | 16±1,4 | 22±1,6 |
| 11. <i>X. anoxopodis</i> pv. <i>glycines</i> 9075 | 0 | 20±1,5 |
| 12. <i>X. anoxopodis</i> pv. <i>glycines</i> 8609 | 0 | 18±1,4 |
| 13. <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>michiganensis</i> 102 | 30±1,8 | 14±1,2 |
| 14. <i>Pantoea agglomerans</i> 8490 | 0 | 48±2,3 |
| Фитопатогенные грибы | | |
| 1. <i>A. alternata</i> 16814 | 30,0±1,2 | 21,0±1,4 |
| 2. <i>A. culmorum</i> 00790 | 9,5±1,0 | 13,5±1,2 |
| 3. <i>F. oxysporum</i> 54201 | 16±1,2 | 19,5±0,9 |
| 4. <i>F. oxysporum</i> n. 33 | 12±1,1 | 14±1,2 |
| 5. <i>F. tricinetum</i> 00795 | 12,0±1,1 | 16,5±1,4 |
| 6. <i>Cladosporium herbarum</i> 16863 | 0 | 11,0±1,1 |
| 7. <i>Cochliobolus spicifas</i> 16860 | 0 | 12,5±1,2 |
| 8. <i>Nigrospora oryzae</i> 16 864 | 23±1,6 | 27±1,7 |

Как супернатант культуральной жидкости, так и экстракт биомассы *S. netropsis* ИМВ Ас-5025 проявляли достаточно высокую антагонистическую активность по отношению к большинству исследуемых фитопатогенных бактерий. Наиболее чувствительными к действию супернатанта культуральной жидкости были *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7886

и *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* 102, зоны ингибирования роста – 42 и 30 мм соответственно. Следует отметить, что в большинстве случаев супернатант культуральной жидкости более активно подавлял рост фитопатогенных бактерий по сравнению с экстрактом биомассы. В то же время рост *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9060, *P. corrugata* 9070, *X. anoxopodis* pv. *glycines* 9075, *X. anoxopodis* pv. *glycines* 8609 и *Pantoea agglomerans* 8490 ингибировал только экстракт биомассы. Нечувствительными к метаболитам *S. netropsis* ИМВ Ас-5025 оказались *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8291 и *X. visicatoriae* 7790.

Экстракт биомассы *S. netropsis* ИМВ Ас-5025 ингибировал рост всех исследованных штаммов фитопатогенных грибов (табл. 2). Супернатант культуральной жидкости также проявлял угнетающее действие на грибы, за исключением *Cladosporium herbarum* 16863 и *Cochliobolus spicifas* 16860.

Отличие в действии на фитопатогены супернатанта культуральной жидкости и этанольного экстракта может свидетельствовать о различном составе вне- и внутриклеточных метаболитов с антимикробными свойствами. Известно, что многие антибиотики стрептомицетов могут накапливаться только в мицелии и проявлять свое действие на возбудителей после экстрагирования [24].

Широкое развитие бактериозов с одной стороны и практически полное отсутствие экологически безопасных средств биологической защиты от них, с другой, вынуждают производителей стран Европы, США, Индии и Японии использовать в растениеводстве антибиотики медицинского назначения: стрептомицин, тетрациклин, хлорамфеникол и др. [4, 9, 10]. Это приводит к появлению множественной антибиотикорезистентности у больных. В связи с этим для растениеводства необходимо разрабатывать биопрепараты, не применяющиеся в медицине. Поэтому на следующем этапе изучили антимикробное действие *S. netropsis* ИМВ Ас-5025 на референтные штаммы условно-патогенных для человека микроорганизмов. Оценка действия супернатанта культуральной жидкости и этанольного экстракта биомассы исследуемого штамма на спектр референтных штаммов показала, что метаболиты продуцента практически не угнетали их рост, кроме *Pseudomonas aeruginosa* и *Aspergillus niger*, зоны ингибирования которых не превышали 10 мм. Следовательно, применение изучаемого штамма стрептомицета *S. netropsis* ИМВ Ас-5025 в области медицины не является перспективным. В то же время в мире остро ощущается недостаток экологически безвредных средств для защиты растений от заболеваний, вызванных фитопатогенами [1, 6].

Таким образом, на основании изученных морфолого-культуральных, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических свойств исследуемый штамм идентифицирован как *S. netropsis* (Finlay et al, 1951) ИМВ Ас-5025 (УКМ Ас-2186). Почвенный стрептомицет не оказывает угнетающего действия на условно-патогенные микроорганизмы и проявляет активный антагонизм по отношению к фитопатогенным бактериям и грибам-возбудителям заболеваний зерновых, бобовых и овощных культур, что позволяет рекомендовать его для применения в растениеводстве в качестве биологического средства защиты растений.

Выражаем благодарность акад. НААН Украины В.Ф. Патыке и

д.б.н. И.Н. Курченко за предоставленные тест-культуры фитопатогенов, а также С.И. Войчуку, к.б.н., старшему научному сотруднику отдела промышленных микроорганизмов ИМВ НАН Украины за помощь в изучении поверхности оболочек спор стрептомицета с использованием трансмиссионной электронной микроскопии.

**Л.О. Білявська¹, Т.А. Єфіменко², О.В. Єфременкова²,
В.Є. Козирицька¹, Г.О. Іутинська¹**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

²Науково-дослідний інститут з пошуку нових антибіотиків ім. Г.Ф. Гаузе,
вул. Велика Пироговська, 11, Москва, 119021, Росія

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА АНТАГОНІСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ҐРУНТОВОГО СТРЕПТОМИЦЕТА *STREPTOMYCES* SP. 100

Резюме

Мета. Визначити таксономічне положення ґрунтового стрептомицета *Streptomyces* sp. 100 та вивчити антагоністичні властивості щодо фітопатогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. **Методи.** Для ідентифікації штаму використовували загальноприйняті методи вивчення морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей продуцента, а також проводили аналіз 16S рРНК. Антагоністичну активність штаму вивчали методом дифузії в агар. **Результати.** Ґрунтовий стрептомицет, ідентифікований як *Streptomyces netropsis* (Finlay et al, 1951) IMB Ac-5025 (УКМ Ac-2186), за вирощування на агаризованих середовищах пригнічував ріст фітопатогенних бактерій (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 8609, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571, *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* 9030) і грибів (*Alternaria alternata* 16814, *Fusarium oxysporum* 54201); зони затримки росту 20–32 і 16–30 мм відповідно. Встановлено інгібуючу дію супернатанту культуральної рідини і етанольного екстракту біомаси стрептомицета щодо фітопатогенних бактерій і грибів, із яких найбільш чутливими виявилися *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciense* 7886, *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* 102, *Alternaria alternata* 16814. Штам не пригнічував ріст умовно-патогенних мікроорганізмів (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus pumilus* NCTC 8241, *Staphylococcus aureus* FDA 209P та ін.). **Висновки.** Активний антагонізм досліджуваного штаму стрептомицета по відношенню до фітопатогенів дозволяє рекомендувати його для застосування у рослинництві як біологічного засобу захисту рослин.

Ключові слова: ґрунтовий стрептомицет, ідентифікація, 16S рРНК, *Streptomyces netropsis*, фітопатогени, антагоністична активність.

**L.A. Biliavska¹, T.A. Efimenko², O.V. Efremenkova²,
V.Ye. Koziritska¹, G.A. Iutynska¹**

¹D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

²Gauze Institute of New Antibiotics, 11 Bol'shaya Pirogovskaya Str., Moscow, 119021, Russia

IDENTIFICATION AND ANTAGONISTIC PROPERTIES OF THE SOIL STREPTOMYCETE *STREPTOMYCES* SP. 100

S u m m a r y

Aim. Determination of the taxonomic status of the soil streptomycete *Streptomyces* sp. 100 and study of its antagonistic properties against phytopathogenic and opportunistic human microorganisms. **Methods.** For the identification of the strain a set of conventional methods morphological and cultural, physiological and biochemical characteristics of the producer, as well as molecular genetic analysis of 16S rRNA gene were used. Streptomycete was cultivated on agar nutrient and liquid soy medium until the stationary phase of growth. The antagonistic activity of the strain was studied by agar diffusion method. **Results.** The study of morphological and cultural properties showed that *Streptomyces* sp. 100 formed the colonies with irregular edges protruding from the depressed center, straight sporophores were short, gathered in whorls; spores were oval, smooth shell disperse. Growing on agar medium (pH 6.8–7.4, temperature 28 °C, microaerophilic conditions) this strain formed mycelium of various colors: the air white, white-yellow, white-brown or substrate tan, cream and yellow, creamy carmine, yellow-brown. A soluble pigment was yellow and yellow-brown, while melanoid pigment was not detected. The morphological, cultural, physiological, biochemical and molecular genetic characteristics of the soil streptomycete let to identify it as *Streptomyces netropsis* (Finlay et al, 1951) IMV Ac-5025 (UCM Ac-2186) that is an active antagonist IMV Ac-5025 against plant pathogens. Growing on a surface of agaric nutrient media it inhibits phytopathogenic bacteria (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 8609, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571, *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9030) and fungi (*Alternaria alternata* 16814, *Fusarium oxysporum* 54201) zone of growth inhibition were 20–32 mm and 16–30 mm respectively. The supernatant of culture medium and the ethanol extract of biomass inhibited the growth of pathogenic bacteria and fungi. The most sensitive to action of a supernatant of cultural liquid were *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7886 and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* 102, growth inhibition zones – 42 and 30 mm respectively. It should be noted that in the majority of cases the supernatant of cultural liquid suppressed growth of phytopathogenic bacteria in comparison with biomass extract more actively. At the same time only biomass extract inhibited the growth of *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9060, *P. corrugata* 9070, *X. axonopodis* pv. *glycines* 9075, *X. axonopodis* pv. *glycines* 8609 and *Pantoea agglomerans* 8490. Tolerant to metabolites of *S. netropsis* IMV Ac-5025 were *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8291 and *X. visicariae* 7790. The extract of biomass *S. netropsis* IMV Ac-5025 inhibited growth of all studied strains of phytopathogenic fungi (*A. alternata* 16814, *A. culmorum* 00790, *F. oxysporum* 54201, *F. tricinctum* 00795, *F. oxysporum* n.33, *Cladosporium herbarum* 16863, *Cochliobolus spicifas* 16860, *Nigrospora oryzae* 16864). The supernatant of the cultural liquid also showed the oppressing action on fungi, except for *Cladosporium herbarum* 16863 and *Cochliobolus spicifas* 16860. The strain was almost ineffective against opportunistic human microorganisms (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus pumilus* NCTC 8241, *Staphylococcus aureus* FDA 209P et al.). **Conclusions.** The lack of action of *Streptomyces netropsis* IMV Ac-5025 on the opportunistic human microorganisms and the active antagonism of phytopathogens, both, define potential its application for plant protection.

Key words: soil streptomycete, identification, 16S rRNA, *Streptomyces netropsis*, phytopathogens, antagonistic activity.

1. Otto-Hanson L.K., Grabau Z., Rosen C., Salomon C.E., and Kinkel L.L. Pathogen variation and urea influence selection and success of *Streptomyces* mixtures in biological control. *Phytopathology*. 2013; **103** (1): 34–42.
2. Bioregulation of microbial-plant systems: Monograph/ Editors G.A. Iutynska, S.P. Ponomarenko. Kyiv: Nichlava, 2010. – 472 p.
3. Aktar Md.W, Sengupta D., Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards Interdiscip. *Toxicol. Mar.* 2009; **2** (1): 1–12.
4. Berdy J. Bioactive microbial metabolites: A personal view. *The Journal of Antibiotics*. 2005; **58**:1-26.
5. Biliavska L.A., Kozyriska V.E., Kolomiets Y.V., Babich A.G., Iutynska G.O. Phytoprotective and growth-regulatory properties of bioformulations on the base of soil streptomycetes metabolites. *Dopovidi NANU*. 2015; **1**: 131–37.
6. Pliego C., Ramos C., de Vicente A., Cazorla F. Screening for candidate bacterial bio-control agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil* 2011; **340**: 505–520.
7. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007; **71** (3): 495–548.
8. Valli S., Suvathi S.S., Aysha O., Nirmala P., Vinoth K.P., Reena A. Antimicrobial potential *Actinomycetes* species isolated from marine environment. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2012; **2** (6): 469–473.
9. Nan Z., Zhen S., Yuhua X., Ping C., Hongxia J., Tao Y., Ruicheng J., Yuhua Z., Jinyu Li., Xunli L. Identification and characterization of antifungal active substances of *Streptomyces hygrosopicus* BS-112. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2013; **29** (8): 1443.
10. Genilloud O., Ganzalez I., Salazar O., Martin J., Tormo J.R., Vicente F. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011; **38** (3): 375–89.
11. Pandey A., Ali I., Butola K.S., Chatterji T., Singh V. Isolation and characterization of *Actinomycetes* from soil and evaluation of antibacterial activities of *Actinomycetes* against pathogens. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* 2011; **2** (4): 384–92.
12. Brader G., Compant S., Mitter B. et al. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014; **27**: 30–37.
13. Iutynska G. Elaboration of natural polyfunctional preparations with antiparasitic and biostimulating properties for plant growing. *Microbiologichny zhurnal*. 2012; **74** (4): 3–12.
14. Hussein A.A.E., Alhasan R.E.M., Abdelwahab S.A. and Siddig M.A.E. Isolation and Identification of *Streptomyces rochei* Strain Active against Phytopathogenic Fungi. *British Microbiology Research Journal*. 2014; **4**(10): 1057–1068.
15. Tsygankova V.A., Andrusevich Ya.V., Biljavskaya L.A., Kozyriska V.E., Iutynska H.O., Galkin A.P., Galagan T.O., Boltovska O.V. Growth Stimulating, Fungicidal and Nematicidal Properties of New Microbial Substances and Their Impact on si/miRNA Synthesis in Plant Cells. *Microbiologichny zhurnal*. 2012; **6**: 36–46.
16. Valagurova E.V., Kozyrskaya V.E., Iutynska G.A. *Actinomycetes* of *Streptomyces* genus. Description of species and computer program of their identification. Kyiv: Naukova dumka, 2004. – 648 p.

17. Lemos M.L., Toranzo A.E., Barja J.L. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweed. *Microbiat. Ecol.* 1985; **11**: 149–163.
18. PCR protocols: a guide to methods and applications / Eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. New York: Academic Press, 1990.
19. Manucharova N.A. Molecular-biological aspects of research in ecology and microbiology. Moscow: Tutorial. Grif. ULV.M.: Publishing house of Moscow Univ., 2010. – 48 p.
20. Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T.L., Agarwala R., Schäffer A.A. Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. *Bioinformatics.* 2008; **24**: 1757–1764.
21. Biliavska L.O., Kozyriska V.E., Valagurova O.V., Iutynska G.O. Biologically active substances of new microbial preparation Avercom. *Microbiologichny zhurnal.* 2012; **74** (3): 10–15.
22. Ukrainian Collection of Microorganisms. Catalogue culture / Ed. V.S. Pidgors'kyj, O.I. Kosofyak, E.A. Kipryanova, R.I. Gvosdyak. Kyiv: Naukova dumka, 2009. – 320 p.
23. Berg G, Marten P, Minkwitz A, Bruckner S. Efficient biological control of fungal plant diseases by *Streptomyces* sp DSMZ 12424. *Z Pflanzenk Pflanzen.* 2001; **108**: 1-10.
24. Ning L., Yong-cun Z. Screening of Antagonistic *Actinomyces* against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* from Compost. *J. Modern Agricultural Sciences.* 2008; **1**: 71–93.
25. Krassilnikov N.A. The ray fungi (highest forms). Moscow: Nauka, 1970. – 535 p.
26. Waksman S.A. The Actinomycetes, Classification, Identification and Description of Genera and Species. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1961; **2**: 61–292.
27. Whitman W.B., Parte A., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M.E., Ludwig W., Suzuki K. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Actinobacteria. Part A-B. Second edition. Bergey's Manual Trust, 2012. **5**: 2105 p.
28. Jin J.-l., Wang C., Lei T., Gao P.-J. Isolation and classification of *Streptomyces netropsis* strain SD-07 which produces polyene macrolide antibiotics with broad-spectrum and high antifungal activity. *Journal of Shandong University (Natural Science).* 2009; **5**: 34–48.
29. Jang J.Y., Kim J.-C., Choi Y.H., Joo Y.-J., Kim H., Jang K.S., Choi G.J., Kim C.-J., Cha B., Park H.W. Characterization of *Streptomyces netropsis* Showing a Nematocidal Activity against *Meloidogyne incognita*. *Research in Plant Disease.* 2015; **21** (2): 50–57 DOI 10.5423/RPD.2015.21.2.050

Отримано 15.11.2015