

## ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ШТАМУ *STREPTOMYCES* SP. JE 1-6, ВИДІЛЕНОГО З РИЗОСФЕРНОГО ҐРУНТУ *JUNIPERUS EXCELSA* VIEB.

С.І. ТІСТЕЧОК<sup>1</sup>, І.В. ТИМЧУК<sup>2</sup>, О.В. КОРНІЙЧУК<sup>2</sup>, В.О. ФЕДОРЕНКО<sup>1</sup>, А.М. ЛУЖЕЦЬКИЙ<sup>3,4</sup>, О.М. ГРОМИКО<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Кафедра генетики та біотехнології, Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна

<sup>2</sup> Кафедра мікробіології, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

<sup>3</sup> Кафедра фармацевтичної біотехнології, Саарландський університет, Саарбрюккен, Німеччина

<sup>4</sup> Гемгольцьський інститут фармацевтичних досліджень Саарланду, Саарбрюккен, Німеччина

\* E-mail: oleksandr.gromyko@lnu.edu.ua

Актинобактерії, виділені з малодосліджених біотопів, становлять інтерес як продуценти біологічно активних сполук. В цій роботі ми повідомляємо про продуцента антибіотика лідикаміцину *Je 1-6*, виділеного з ризосферного ґрунту ялівцю високого *Juniperus excelsa* Vieb. (Кримський півострів, Україна), який виявляв антагоністичні властивості проти грам-позитивних бактерій. На основі аналізу послідовності гена 16S рРНК штаму *Je 1-6* був афілійований до роду *Streptomyces*. Неочищений екстракт з біомаси цього штаму пригнічував ріст різних шпитальних мультирезистентних ізолятів *Staphylococcus* sp. В результаті дереплікативного аналізу в екстракті *Streptomyces* sp. *Je 1-6* виявлено антибіотик лідикаміцин та його похідні: 30-деметиллідикаміцин, 30-деметил-8-дезоксилідикаміцин і 8-дезоксилідикаміцин. Мультилокусний аналіз, на основі гена 16S рРНК і п'яти генів «домашнього господарства» *atrD*, *gyrB*, *groB*, *recA* та *trpB* штаму *Streptomyces* sp. *Je 1-6*, показав високий рівень їхньої ідентичності з генами штаму *Streptomyces* sp. ID38640.

**Ключові слова:** *Streptomyces*, мультилокусний аналіз, філогенетичний аналіз, лідикаміцин, гени «домашнього господарства».

**Вступ.** Антибіотики є одними з найуспішніших лікарських засобів, розроблених впродовж минулого століття, які використовуються для збереження життя та здоров'я людини (Аміпов, 2017). Однак їхнє широке і необмежене використання зумовило появу мікроорганізмів з множинною резистентністю до антибіотиків. Це, в свою чергу, призвело до збільшення кількості невиліковних або таких, що погано піддаються лікуванню бактеріальних інфекцій (Ventola, 2015). Пошук нових природних спо-

лук із антибіотичною активністю, які можуть бути використанні як основа для створення хімотерапевтичних препаратів, може мати ключове значення для вирішення цієї проблеми. Бактерії порядку *Actinomycetales*, а особливо рід *Streptomyces*, є одним з основних продуцентів біологічно активних природних сполук (Geniloud, 2017). Сьогодні особлива увага приділяється актиноміцетам, виділеним з унікальних або слабо досліджених екологічних ніш (наприклад, Кримський півострів), оскільки вони можуть стати джерелом нових, біологічно активних природних сполук (Ahmad et al., 2017).

Ризосфера рідкісних і лікарських рослин багата мікроорганізмами, такими як актиноміцети, які здатні продукувати широкий спектр антимікробних сполук (Khamna et al., 2009). У попередніх дослідженнях ми повідомляли про широкий спектр антимікробних властивостей актиноміцетів ризосфери ендемічних і рідкісних рослин Кримського півострова. Зокрема, хімічний аналіз метаболітів стрептоміцетів, виділених з ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb., виявив дві нові антибіотичні сполуки: лінійного полікетидного антибіотика юніпероліду А (Raju et al, 2012a) та леополової кислоти А (Raju et al, 2012b). Це демонструє потенціал актиноміцетних штамів, виділених із ризосферного ґрунту *J. excelsa*, до продукування сполук із антибіотичною активністю.

Це дослідження зосереджене на філогенетичному аналізі штаму актиноміцетів *Streptomyces* sp. *Je 1-6*, виділеного з ризосферного ґрунту ялівцю, його антимікробній активності та дослідженні спектру вторинних метаболітів, які він продукує.

**Методи та матеріали.** *Штами та умови вирощування.* У роботі використано штаму *Je 1-*

© С.І. ТІСТЕЧОК, І.В. ТИМЧУК, О.В. КОРНІЙЧУК, В.О. ФЕДОРЕНКО, А.М. ЛУЖЕЦЬКИЙ, О.М. ГРОМИКО, 2021

6, який виділений з ризосферного ґрунту *J. excelsa*, що зібраний біля підніжжя гори Кішка (Кримський п-в) (GPS: N 44° 24'02.07" E 33°59'32.96"). Цей штам депонований у Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків (ККМПА) Львівського національного університету імені Івана Франка. Штами стафілококів, використані в роботі, наведені в табл. 1 та були отримані з колекції мікроорганізмів Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (ЛМУ).

Штами стафілококів вирощували на середовищі LA (Kieser et al., 2000). Штам Je 1–6 вирощували за стандартних умов (Kieser et al., 2000), використовуючи манітол-соєве середовище (г/л: соєве борошно – 20,0; D-манітол – 20,0; агар – 2,00; рН 7,2), вівсяне середовище (г/л: вівсяне борошно – 20,0; агар – 20,0; рН 7,2) і рідкий триптон-соєвий бульйон (TSB, Sigma-Aldrich). Для продукції вторинних метаболітів використовували рідкі середовища: декстрин-соєве ферментаційне середовище DNPM (г/л: декстрин – 40; соєвий пептон – 7,5; пекарські дріжджі – 5,0; 3-[N-морфоліно]пропансульфонова кислота (MOPS) – 21,0; рН 7,2) (Bilyk et al., 2016) та глюкозо-соєве SG (г/л: глюкоза – 20,0; соєвий пептон – 10,0; CaCO<sub>3</sub> 2; рН - 7,2) (Rebets et al., 2003).

**Ферментація та екстрагування.** Здатність штаму Je 1–6 продукувати вторинні метаболіти вивчали, вирощуючи його в рідких середовищах DNPM і SG. Для отримання посівної

культури штам Je 1–6 засівали в 10 мл середовища TSB та культивували впродовж 2 діб при температурі 28 °С на качалці при 180 об/хв. 2 мл посівної культури інокулювали в 50 мл середовища DNPM і SG і культивували протягом 6 діб при температурі 28 °С та 180 об/хв. Відокремлювали біомасу від культуральної рідини за допомогою центрифугування (6000 об/хв впродовж 5 хв). Для екстракції вторинних метаболітів з надосадової рідини використовували рівний об'єм етилацетату, а з біомаси – суміш ацетон:метанол (1 : 1) (15 мл). Екстракцію проводили впродовж двох годин, струшуючи на шейкері (140 об/хв). Після екстракції, шляхом центрифугування (6000 об/хв впродовж 5 хв), екстракти відокремлювали від надосадової рідини після екстракції етилацетатом та від біомаси після екстракції сумішшю ацетон:метанол. Отримані екстракти випарювали за допомогою ротаційного випарника ІКА RV-8 (ІКА, Німеччина) при температурі 40 °С і розчиняли в 1 мл метанолу.

**Рідинна хроматографія – мас-спектрометрія (PX–МС) та дереплікативний аналіз.** Аналіз екстрактів проводили на Thermo Dionex Ultimate 3000 RSLC («Waters», Німеччина) за допомогою мас-спектрометра Thermo LTQ Orbitrap XL використовуючи колонку VEN C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм d<sub>p</sub>). Як мобільну фазу використовували воду з 0,1%-ною мурашиною кислотою та ацетонітрил з 0,1%-ною мурашиною кислотою при швидкості потоку 0,6 мл/хв

Таблиця 1. Штами стафілококів, використані у роботі

Штам	Фенотип резистентності	Джерело
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Референтний штам	ККМПА
<i>S. aureus</i> LMU – 23	Vnr, Oxa, Amp, Amo, Pip, Imi, Cef, Bac, Cip, OfI, Gen, Tet	ЛМУ, виділений від хворого на муковісцидоз
<i>S. aureus</i> LMU – 115	Vnr Oxa, Amp, Amo, Pip, Imi, Cef, Bac, Cip, OfI, Rif, Gen	ЛМУ, виділений з крові пацієнта після операції
<i>S. aureus</i> LMU – 140	Vnr, Oxa, Amp, Amo, Cef, Bac, Cip, Gen, Tob, Ami, Tet, Azi, Ery	ЛМУ, виділений від хворого на муковісцидоз
<i>S. lentus</i> LMU – 19	Vnr, Oxa, Amp, Amo, Pip, Imi, Cef, Bac, Cip, OfI, Rif, Gen, Ami, Tet, Azi, Ery	ЛМУ, виділені з сечі дитини

**Примітка.** Vnr – стійкість до бензилпеніциліну; Oxa – оксациліну; Amp – ампіциліну; Amo – амоксициліну/клавуланової кислоти; Pip – піперациліну; Imi – іміпенему; Cef – цефазоліну; Bac – бацитрацину; Cip – ципрофлоксацину; OfI – офлоксацину; Rif – рифампіцину; Gen – гентаміцину; Tob – тобраміцину; Ami – амікацину; Tet – тетрацикліну; Azi – азитроміцину; Ery – еритроміцину.

впродовж 18 хв. Детекцію маси здійснювали в позитивному режимі з діапазоном 200–2000 m/z. Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення Thermo Xcalibur, версія 3.0. Моноізотопні маси порівнювали в базі даних природних сполук DNP (Dictionary of Natural Products, CRC Press) (Buckingham, 1993) за такими параметрами: точна молекулярна маса, спектр поглинання, джерело виділення, фрагментація та фізичні характеристики (Running, 1993). Сполуки вважали подібними, коли різниця між точними масами була меншою 5 ppm, а спектр поглинання та фрагментація були ідентичними.

**Аналіз антимікробної активності.** Екстракти метаболітів штаму Je 1–6 тестували на антистафілококову активність методом дифузії в агар (Вауер et al., 1996). Пробірки з 5 мл напіврідкого LA (г/л: триптон — 10,0; NaCl — 10,0; дріжджового екстракту — 5,0; агару — 7,0) інокулювали тест-штамами стафілококів. Вміст пробірок виливали на поверхню середовища LA у чашках Петрі. На стерильні паперові диски (d = 4 мм) наносили по 25 мкл екстрактів, диски висушували і поміщали на середовище, засіяне тест-штамами. Як негативний контроль використали паперові диски з метанолом. Після 24 год культивування при температурі 37 °C вимірювали зони інгібування росту стафілококів з точністю ± 1 мм.

**Ампліфікація та секвенування генів «домашнього господарства».** Для виділення ДНК штам Je 1–6 вирощували в середовищі TSB впродовж 3 днів при температурі 28 °C і швидкості обертання кочалки 180 об/хв. Сумарну ДНК виділяли методом висолювання, як описано в (Kieser et al., 2000). Ампліфікацію гена 16S рРНК проводили за допомогою праймерів: 8F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'), 1510R (5'-TACGGYTACSTTGTTACGACTT-3'). Ампліфікацію генів «домашнього господарства»: АТФ-синтаза субодиниця бета (*atpD*), ДНК-гіраза субодиниця В (*gyrB*), рекомбіназа А (*recA*), РНК полімераза субодиниця В (*rpoB*) і триптафан-синтаза субодиниця В (*trpB*), здійснювали використовуючи специфічні праймери *atpDPF-atpDPR*, *gyrBPF-gyrBPR*, *recAPF-recAPR*, *rpoBPF-rpoBPR* і *trpBPF-trpBPR* відповідно, як описано раніше в (Guo et al., 2008). ПЛР реакцію проводили в загальному об'ємі

50 мкл, що містить 2,0 мкл геномної ДНК (~50 нг), 1,0 мкл кожного праймера (10 pM), 2,0 мкл дезоксинуклеотид трифосфатів (10,0 mM кожен), 5 мкл 10×ПЛР буфер, 0,5 мкл ДНК-полімерази (1 ОД/мкл) і 38,5 мкл води MilliQ. Параметри ПЛР склали: початкова денатурація при 95 °C впродовж 5 хв, далі 30 циклів денатурації при 95 °C впродовж 30 с, відпал праймерів для 16S рРНК, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* та *trpB* при 53, 63, 65, 60, 65 та 66 °C відповідно протягом 30 с і синтез при 72 °C впродовж 90 с. Фінальний синтез при 72 °C впродовж 10 хв. Отримані продукти ПЛР візуалізували в 1%-ному агарозному гелі, а потім очищали за допомогою QIAquick Gel Ex-traction Kit (Qiagen, Venlo, Нідерланди) та секвенували з форвардним та реверсним праймерами в компанії GATC (Німеччина).

Послідовності генів 16S rRNA, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* та *trpB* штаму Je 1–6 були депоновані в GenBank та отримали номери: MT247673, MT254539, MT254540, MT270178, MT270177 та MT270179, відповідно.

**Філогенетичний аналіз гена 16S рРНК та мультилокусний аналіз (MLSA – multilocus sequence analysis).** Філогенетичний аналіз послідовності гена 16S рРНК штаму Je 1–6 здійснювали в RDP Classifier Release 11 (Wang et al., 2007). Найбільш споріднені види *Streptomyces* до 16S рРНК та інших генів «домашнього господарства» були визначені за даними пошуку в програмі BLAST, бази даних Національного центру біотехнологічних інформацій (NCBI) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> та отримані з GenBank. Нуклеотидні послідовності порівнювали, використовуючи алгоритм MUSCLE (Edgar, 2004). Філогенетичні дерева побудовані в програмі MEGA X (Kumar, 2018) з використанням філогенетичних алгоритмів: з'єднання сусідів (NJ) (Saitou et al., 1987) та максимальної вірогідності (ML) (Felsenstein, 1981). Послідовність гена 16S рРНК *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 використали як корінь для філогенетичного дерева. Еволюційні відстані обчислювалися за допомогою 2-параметрового методу Кімури (Kimura, 1980), а надійність топології дерева оцінювали за допомогою тесту завантаження (500 повторень) (Felsenstein, 1985).

MLSA-аналіз, в який включено нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК і п'яти генів

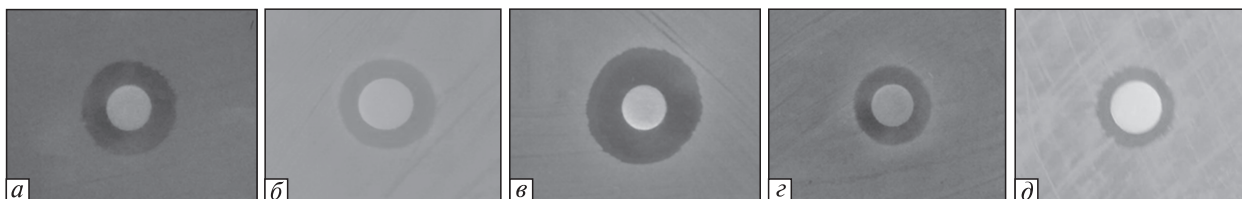


Рис. 1. Антимікробна активність неочищеного екстракту з біомаси штаму Je 1–6 проти штамів стафілококів: а – референтний штам ATCC 25923; б – LMU-23; в – LMU-140; г – LMU-19; д – LMU-115

«домашнього господарства», проводили, як описано раніше (Guo et al., 2008; Maciejewska et al., 2015). Уточнені послідовності генів «домашнього господарства» становили: *atpD* – 496 п.н., *gyrB* – 441 п.н., *recA* – 504 п.н., *rpoB* – 540 п.н. та *trpB* – 567 п.н. Послідовність гена 16S рРНК не змінювалась. Отримано конкатеновану послідовність з шести генів в такому порядку: 16S rRNA-*atpD*-*gyrB*-*recA*-*rpoB*-*trpB* (Maciejewska et al., 2015) (кінцевий розмір послідовності 3936 п.н.). З'єднані послідовності вирівнювали за допомогою MUSCLE (Edgar, 2004). Дерева NJ та ML для MLSA були побудовані, як описано вище.

**Результати.** Виділення та антимікробна активність штаму Je 1–6. Штам Je 1–6 був виділений у 2009 році з ризосферного ґрунту *J. excelsa* шляхом прямого посіву на середовищі ВС. Попередній скринінг виявив його сильну антагоністичну активність щодо грам-позитивних бактерій *Bacillus subtilis* ATCC 31324 та *S. aureus* ATCC 25923 (дані не наводяться). Екстракти, які містять метаболіти цього штаму після його культивування в середовищах SG та DNPM, були використані для оцінки антимікробної активності щодо ширшого кола грам-позитивних бактерій. Для цього використали полірезистентні шпитальні штами стафілококів із різними профілями стійкості до антибіотиків. Етил-ацетатні екстракти культуральної рідини штаму Je 1–6 після вирощування у згаданих вище середовищах не пригнічували росту стафілококів. Однак, екстракти, отримані з біомаси, виявляли антагоністичну активність щодо референтного штаму *S. aureus* та всіх використаних шпитальних ізолятів цього виду та фактичного збудника нозокоміальних інфекцій *S. lentus* (рис. 1). Таким чином, штам Je 1–6 накопичує в біомасі активні сполуки, що здатні інгібувати ріст стафілококів, в тому числі полірезистентних штамів.

Депреплікація вторинних метаболітів, що продукуються штамом Je 1–6. Для визначення сполук із інгібіторною активністю, ми здійснили дереплікативний аналіз вторинних метаболітів, які продукує штам Je 1–6. Після шести днів культивування у рідкому середовищі DNPM біомасу відділяли від культуральної рідини центрифугуванням та екстрагували сумішшю ацетон : метанол (1 : 1). Екстракт біомаси аналізували за допомогою мас-спектрометрії високої роздільної здатності. На отриманій РХ-МС хроматограмі з екстракту біомаси виявлено чотири основні піки (сполуки) (рис. 2, б), які були ановані в базі даних DNP використовуючи такі параметри, як точна молекулярна маса, спектр поглинання та джерело виділення. Ці сполуки ідентифіковані як антибіотик лідикаміцин та його конгенери: 30-деметиллідинаміцин, 30-деметил-8-дезоксилідикаміцин та 8-дезоксилідикаміцин (рис. 2, а). Присутність цих сполук підтверджені наявністю фрагментів вторинних спиртів та  $\alpha$ -карбонілтетрамінової кислоти, а також фрагментів, які утворюються після розщеплення в  $\alpha$ -положеннях піролідинового кільця.

Філогенетичний та MLSA аналізи штаму Je 1–6. Філогенетичний аналіз у програмі RDB Classifier на основі послідовностей генів 16S рРНК (1387 bp) показав, що цей штам штаму Je 1–6 належить до роду *Streptomyces* (рис. 3). Найвища подібність послідовностей серед актиноміцетів, депонованих у GenBank, була зі штамом *S. tubercidicus* 14241 (100 % ідентичності).

BLAST аналіз генів «домашнього господарства» показав, що найближчими родичами для штаму Je 1–6 були *S. libani* subsp. *libani* штам DSM 40555 (100 % гомології для послідовності генів *atpD*), *Streptomyces* sp. ID38640 (99,32; 99,8; 100 та 99,65 % гомології для послідовностей генів *gyrB*, *recA*, *rpoB* та *trpB* відповідно).



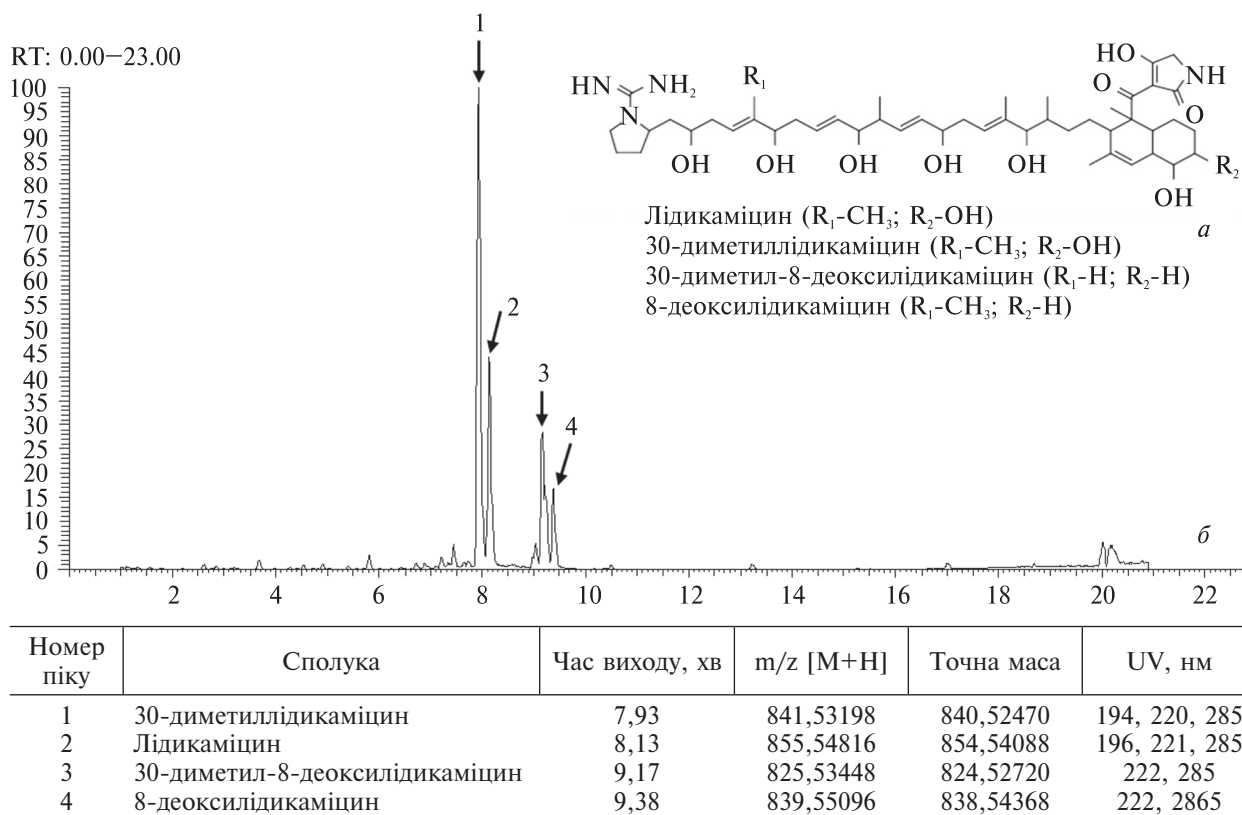


Рис. 2. Хімічні формули лідикаміцину та його похідних (а). РХ-МС хроматограма (б) неочищеного екстракту штаму Je 1–6. Ідентифіковані сполуки (піки) позначено цифрами та їхні характеристики наведені в таблиці

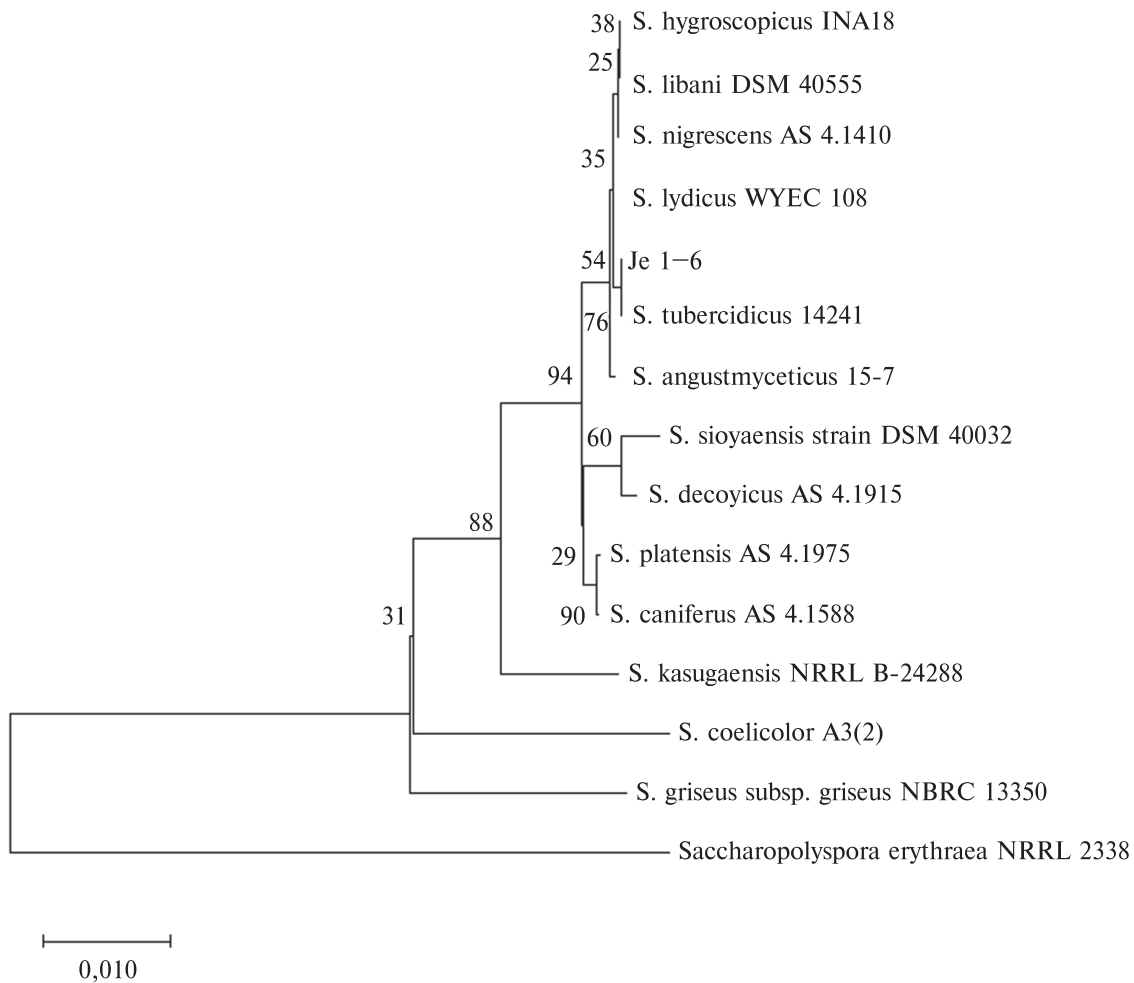
Для MLSA аналізу були використані конкатеновані послідовності шести генів «домашнього господарства» штаму Je 1–6, найближчих його родичів після BLAST аналізу та відомих продуцентів лідикаміцину *S. lydicamycinicus* TP-A0598 і *Streptomyces* sp. NEAUS7GS2. Проте не було знайдено жодних даних про послідовність генів «домашнього господарства» штаму *S. lydicus* 2249-S3.

Філогенетичний аналіз, що ґрунтувався на аналізі конкатенованих послідовностей шести генів «домашнього господарства», показав, що штам Je 1-6 утворює спільну кладу з одним із відомих продуцентів лідикаміцину *Streptomyces* sp. ID38640 (рис. 4). Використані алгоритми для побудови філогенетичного дерева не впливали на його топологію. Крім того, попарні еволюційні відстані між штамом Je 1–6 і продуцентами лідикаміцину *Streptomyces* sp. ID38640, *Streptomyces* sp. NEAUS7GS2 та *S. lydicamycinicus* TP-A0598 за даними аналізу використаних кон-

катенованих послідовностей *atpD-gyrB-recA-rpoB-trpB* становили 0,00243, 0,0756 та 0,0288, відповідно.

**Обговорення.** Скринінг нових протимікробних агентів, з максимальною інгібувальною дією щодо полірезистентних бактерій, а також мінімальною побічною дією, є одним з основних завдань сучасної біотехнології та біомедицини (Kostyanov et al., 2017). Незважаючи на те, що актиноміцети найбільш широко вивчені як продуценти антибіотиків, вони й надалі залишаються джерелом для пошуку нових сполук із протимікробною дією (Geniloud, 2017).

Серед актиноміцетних ізолятів ризосферного ґрунту *J. excelsa* ми виділили штам Je 1-6, який виявив значну антагоністичну активність щодо стафілококів, включаючи полірезистентні клінічні ізоляти стафілококів. Філогенетичний аналіз дав змогу афілювати штам Je 1-6 до роду *Streptomyces*. Представники роду *Streptomyces* ши-



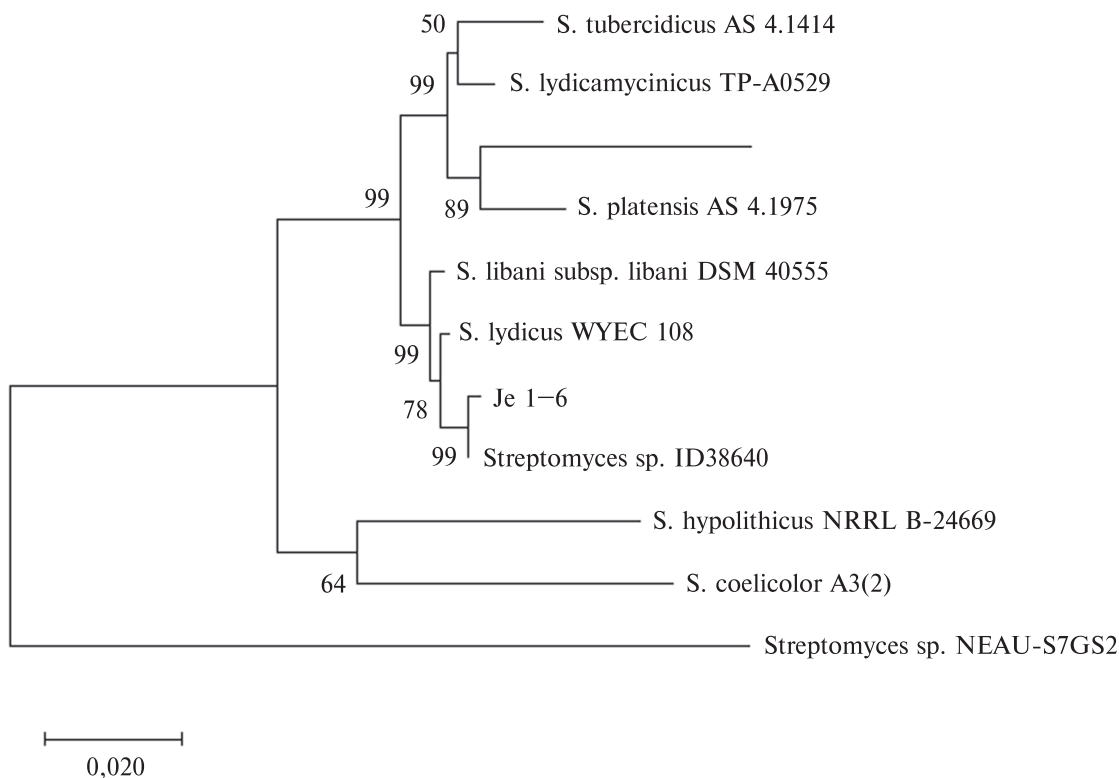
**Рис. 3.** Філогенетичне дерево (NJ) на основі послідовностей гена 16S рРНК, яке показує еволюційні взаємодії штаму Je 1-6 зі спорідненими видами роду *Streptomyces*. Для закорінення дерева використано послідовність гена 16S рРНК *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338. Bar – 0,01 заміни на нуклеотидну позицію

роко розповсюджені в наземних екосистемах, особливо в ґрунті, де вони відіграють важливу роль в ґрунтоутворенні (Goodfellow et al., 1983). Також стрептоміцети відомі як біоконтрольні агенти рослинних інфекцій, оскільки вони можуть виробляти біоактивні сполуки з антагоністичною дією проти рослинних патогенів (Vlaen et al., 2016).

Дереплікативний аналіз активних екстрактів штаму *Streptomyces* sp. Je 1-6 встановив, що цей штам продукує лідикаміцин та його конгенери: 30-деметиллідикаміцин, 30-деметил-8-дезоксилідикаміцин та 8-дезоксилідикаміцин. Ці сполуки виявляють потужну активність щодо грам-позитивних бактерій, включаючи ме-

тицилінрезистентні стафілококи (MRSA) та патогенні гриби *Cryptococcus neoformans* (Hayakawa et al., 1991; Furumai et al., 2002). Аналіз хроматограм показав, що мажорними вторинними метаболітами штаму Je 1-6 були лідикаміцин та його конгенери, які, очевидно, й забезпечують його протимікробну активність проти полірезистентних штамів стафілококів.

Сьогодні відомо чотири продуценти лідикаміцинів: *S. lydicus* 2249-S3 (Hayakawa et al., 1991), *S. lydicamycinicus* TP-A0598 (Furumai et al., 2002; Komaki et al., 2020), *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2 (Liu et al., 2019) та *Streptomyces* sp. ID38640 (Sosio et al., 2018). Враховуючи це, ми дослідили філогенетичні зв'язки між



**Рис. 4.** NJ-дерево, засноване на аналізі MLSA часткових послідовностей з шести генів «домашнього господарства» (16S rRNA, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* і *trpB*) штаму Je 1–6, відомих продуцентів лідикаміцину та вибраних репрезентативних штамів роду *Streptomyces*. Bar – 0,02 заміни на нуклеотидну позицію

штамом *Streptomyces* sp. Je 1–6 та з відомими продуцентами лідикаміцинів. Порівняльний аналіз нуклеотидної послідовності генів 16S рРНК є недостатнім для визначення філогенетичних зв'язків серед видів *Streptomyces* sp., через високу консервативність цього гена в межах роду (Guo et al., 2008, Rong et al., 2012) З огляду на це, ми використали MLSA-аналіз, який ґрунтується на порівнянні послідовностей інших генів «домашнього господарства» (*atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* та *trpB*) і дає змогу з'ясувати тонкі філогенетичні взаємозв'язки досліджуваних видів актиноміцетів. Філогенетичний аналіз, що базувався на аналізі конкатенованих послідовностей виявив, що штам *Streptomyces* sp. Je 1–6 найтісніше пов'язаний із штамом *Streptomyces* sp. ID38640. Парна еволюційна відстань для *Streptomyces* sp. Je 1–6 і продуцента лідикаміцину *Streptomyces* sp. ID38640, визначена за аналізом конкатенованих послідовностей п'яти генів «домашнього господарства», була меншою за 0,007, що унеможливило віднесен-

ня цих штамів до різних видів (Rong et al., 2012; Labeda et al., 2014). Таким чином, отримані дані вказують на високий рівень ідентичності нуклеотидних послідовностей проаналізованих генів штамів *Streptomyces* sp. Je 1–6 та ID38640.

Раніше описані штами *S. lydicus* 2249-S3 та *Streptomyces* sp. ID38640 продукують лише лідикаміцин (Hayakawa et al., 1991, Sosio et al., 2018). У геномі штаму *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2 виявлено кластер генів біосинтезу лідикаміцину, однак його продукцію за лабораторних умов не було продемонстровано (Liu et al., 2019). Натомість штам *Streptomyces* sp. Je 1–6 крім лідикаміцину продукує ще і його похідні (рис. 2). Це може бути використано як для вивчення генетичних і біохімічних механізмів біосинтезу цього антибіотика, так для комбінаторного біосинтезу нових лідикаміцинів. Штам *S. lydicamycinicus* TP-A0598 окрім тих лідикаміцинів, які виявлені в екстракті Je 1–6, продукує ще й 14,15-дегідго-8-деоксилідикаміцин. Однак, він був ізольований із

проб морської води, взятих на глибині більш ніж 300 метрів. Такі штами зазвичай важче культивувати порівняно із ґрунтовими актиноміцетами (Furumai et al., 2002; Komaki et al., 2020). Отже, як продуцент лідикаміцинів, штам *Streptomyces* sp. Je 1–6 має певні переваги над раніше описаними продуцентами цих антибіотиків.

**Висновки.** Штам *Streptomyces* sp. Je 1–6 виділений із ризосферного ґрунту *J. excelsa*, який був зібраний на території Кримського півострова, Україна. На основі аналізу послідовності гена 16S рРНК штам Je 1–6 був афілійований до роду *Streptomyces*. Дереплікативний аналіз сирого екстракту біомаси цього штаму привів до аотації антибіотика лідикаміцину та його конгенерів. Філогенетичний аналіз на основі MLSA штаму Je 1–6 вказав на високий рівень ідентичності нуклеотидних послідовностей його генів «домашнього господарства» з генами *Streptomyces* sp. ID38640. *Streptomyces* sp. Je 1–6 депоновано в Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка (колекційний номер Lv 1-006).

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить жодних досліджень із участю тварин або людей, проведених будь-яким із авторів.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Ця робота підтримана грантом Н/309-2003 Міністерства освіти і науки України (В. Федоренко, О. Громико), держбюджетною темою Міністерства охорони здоров'я України (О. Корнійчук, І. Тимчук) та частково підтримана індивідуальним грантом FEMS-GO-2017-001 для С. Тістечка.

GENETIC IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF STREPTOMYCES SP. STRAIN JE 1–6, ISOLATED FROM RHIZOSPHERE SOIL OF JUNIPERUS EXCELSA BIEB.

S.I. Tistechok, I.V. Tymchuk, O.P. Korniychuk, V.O. Fedorenko, A.M. Luzhetskyy, O.M. Gromyko

Department of Genetics and Biotechnology, Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine  
Department of Microbiology, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Department of Pharmaceutical Biotechnology, Saarland University, Saarbrücken, Germany  
Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland, Saarbrücken, Germany

E-mail: oleksandr.gromyko@lnu.edu.ua

Actinobacteria isolated from poorly explored biotopes are of interest as producers of biologically active compounds. Here, we report about the producer of lydicamycin Je 1–6, isolated from the rhizosphere soil of *J. excelsa* Bieb. collected from the Crimean Peninsula, Ukraine, that demonstrated its antagonistic activity against gram-positive bacteria. Based on the 16S rRNA gene sequence analysis, the strain Je 1–6 was affiliated to the *Streptomyces* genus. The crude extract from the biomass of this strain showed its activity against gram-positive bacteria, including polyresistant clinical isolates of *Staphylococcus* sp. The dereplication analysis of the extract of strain Je 1–6 resulted in determining lydicamycin and its congeners: 30-demethyllydicamycin, 30-demethyl-8-deoxylydicamycin and 8-deoxylydicamycin. MLSA analysis based on the 16S rRNA gene and five housekeeping genes *atpD*, *gyrB*, *rpoB*, *recA*, and *trpB* of the strain Je 1–6 showed a high level of homology with *Streptomyces* sp. ID38640.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Ahmad MS, El-Gendy AO, Ahmed RR et al. (2017) Exploring the antimicrobial and antitumor potentials of *Streptomyces* sp. AGM12-1 isolated from egyptian soil. *Front. Microbiol.* **8**:438. doi: 10.3389/fmicb.2017.00438.
- Aminov R. (2017) History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochem. Pharmacol.* **133**:4–19. doi: 10.1016/j.bcp.2016.10.001.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC et al. (1996) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**:493–496.
- Bilyk O, Sekurova ON, Zotchev SB et al. (2016) Cloning and heterologous expression of the grecoacycline biosynthetic gene cluster. *PLoS ONE.* **11**(7):e0158682. doi.org/10.1371/journal.pone.0158682.
- Buckingham J. (1993) *Dictionary of Natural Products.* CRC Press/Taylor and Francis Group, London.
- Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**:1792–7. doi:10.1093/nar/gkh340.
- Felsenstein J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**:368–76.
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**:783–91.
- Furumai T, Eto K, Sasaki T et al. (2002) TPU-0037-A,



- B, C and D, novel lydicamycin congeners with anti-MRSA activity from *Streptomyces platensis* TP-A0598. *J. Antibiot.* **55**(10):873–80. doi: 10.7164/antibiotics.55.873.
- Genilloud O. (2017) Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* **34**:1203–32. doi: 10.1039/c7np00026j.
- Goodfellow M, Williams S. (1983) Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**:189–216.
- Guo Y, Zheng W, Rong X et al. (2008) A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:149–59. doi: 10.1099/ijs.0.65224-0.
- Hayakawa Y, Kanamaru N, Shimazu A et al. (1991) Lydicamycin, a new antibiotic of a novel skeletal type. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiot.* **44**(3):282–7.
- Khamna S, Yokota A, Lumyong S. (2009) Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**:649–55. doi: 10.1007/s11274-008-9933-x.
- Kieser B, Buttner M, Charter K, Hopwood B. (2000) Practical Streptomyces genetics. John Innes Foundation, Norwich.
- Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:111–20.
- Komaki H, Hosoyama A, Igarashi Y et al. (2020) *Streptomyces lydicamycinicus* sp. nov. and its secondary metabolite biosynthetic gene clusters for polyketide and nonribosomal peptide compounds. *Microorganisms*. **8**(3):370. doi: 10.3390/microorganisms8030370.
- Kostyanev T, Can F. (2017) The Global Crisis of Antimicrobial Resistance. In: Pulcini C, Ergonul O, Can F, Beovic B (eds) *Antimicrobial Stewardship*, 1st edn, Academic Press, Cambridge, p. 3–12.
- Kumar S, Stecher G, Li M et al. (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Bio. Evol.* **35**(6):1547–9. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Labeda DP, Doroghazi JR, Ju KS et al. (2014) Taxonomic evaluation of *Streptomyces albus* and related species using multilocus sequence analysis and proposals to amend the description of *Streptomyces albus* and describe *Streptomyces pathocidini* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**:894–900. doi: 10.1099/ijs.0.058107-0.
- Liu D, Yan R, Fu Y et al. (2019) Antifungal, plant growth-promoting, and genomic properties of an endophytic actinobacterium *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2. *Front Microbiol* **10**:2077. doi: 10.3389/fmicb.2019.02077.
- Maciejewska M, Pessi IS, Arguelles-Arias A et al. (2015) *Streptomyces lunaelactis* sp. nov., a novel ferroverdin A-producing *Streptomyces* species isolated from a moonmilk speleothem. *Antonie van Leeuwenhoek.* **107**:519–31. doi: 10.1007/s10482-014-0348-4.
- Raju R, Gromyko O, Fedorenko V et al. (2012a) Juniperolide A: A New polyketide isolated from a terrestrial actinomycete, *Streptomyces* sp. *Org. Lett.* **14**(23):5860–3. doi: 10.1021/ol302766z.
- Raju R, Gromyko O, Fedorenko V et al. (2012b) Leopolic acid A, isolated from a terrestrial actinomycete, *Streptomyces* sp. *Tetrahedron. Lett.* **53**:6300–1. doi: 10.1016/j.tetlet.2012.09.046.
- Rebets Y, Ostash B, Luzhetskyy A et al. (2003) Production of landomycins in *Streptomyces globisporus* 1912 and *S. cyanogenus* S136 is regulated by genes encoding putative transcriptional activators. *FEMS Microbiol. Lett.* **222**:149–53. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00258-1.
- Rong X, Huang Y. (2012) Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. *Syst. Appl. Microbiol.* **35**(1):7–18. doi: 10.1016/j.syapm.2011.10.004.
- Running W. (1993) Computer software reviews. Chapman and hall dictionary of natural products on CD-ROM. *J. Chem. Inf. Model.* **33**:934–5.
- Saitou N, Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–25.
- Sosio M, Gaspari E, Iorio M et al. (2018) Analysis of the Pseudouridimycin biosynthetic pathway provides insights into the formation of C-nucleoside antibiotics. *Cell Chem. Biol.* **25**:540–9. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.02.008.
- Ventola CL. (2015) The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and Threats. *P&T.* **40**(4):277–83.
- Viaene T, Langendries S, Beirinckx S et al. (2016) *Streptomyces* as a plant's best friend? *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**(8):fiw119. doi: 10.1093/femsec/fiw119.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:5261–7. doi: 10.1128/AEM.00062-07.

Надійшла в редакцію 18.05.20  
Після доопрацювання 27.08.20  
Прийнята до друку 18.01.21