

<https://doi.org/10.15407/frg2024.04.333>

УДК 004.2:579.234:579.246.2:579.252.2:579.873.71

ДЕТЕРМІНАЦІЯ ФОРМУВАННЯ ПЕЛЕТ У ШТАМУ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-4Crt

Л.В. ПОЛІЩУК, О.І. БАМБУРА, В.В. ЛУК'ЯНЧУК

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України
03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 154
e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

Стрептоміцети є промисловими продуцентами антибіотиків, ферментів, вітамінів. При культивуванні стрептоміцетів у рідкому середовищі біореакторів їх міцелій формує пелети. У зв'язку з впливом агрегації гіфів на ефективність мікробіологічного виробництва, вивчення впливу генетичної детермінації формування пелет за глибинного культивування є актуальним завданням. Мета роботи — визначити наявність в геномі *wild type* штаму *S. globisporus* 1912 генів, продукти яких забезпечують агрегацію гіфів у пелети. Аналізували геномні послідовності 2 мутантів (1912-4Crt та 1912-2) штаму *S. globisporus* 1912. Варіант 1912-4Crt є спонтанним мутантом вихідного штаму, який почав продукувати каротиноїди. У варіанта 1912-2 мутація призвела до зниження синтезу ландоміцину Е. Послідовність геномної ДНК мутанта *S. globisporus* 1912-4Crt представлена в базі даних GenBank (доступ QWFA00000000.1). Первинна структура геномної ДНК варіанта 1912-2 не представлена в базах даних National Center for Biotechnology Information (NCBI). Вирівнювання послідовностей проведено програмами BLASTN сервера NCBI. Міцелій стрептоміцету вирощували в середовищі Оканіші з перемішуванням при температурі 28 °С протягом 3 діб. Оскільки при культивуванні *wild type* штаму *S. globisporus* 1912 і його мутантів у рідкому середовищі їх міцелій формує пелети, то очікували наявність в хромосомі принаймні одного з вказаних кластерів. За допомогою BLASTN-аналізу в геномах 2 варіантів *S. globisporus* 1912 виявлено послідовності, що подібні структурам обох кластерів агрегації міцелію штамів *S. coelicolor* A3(2) й *S. griseus* NBRC 13350. Однак, якщо *mat*-кластер представлений в одному екземплярі на хромосому кожного мутанта, то по два *csIA/glxA/dtpA*-кластери виявлено в хромосомах як варіанта 1912-4Crt, так і варіанта 1912-2. Аналізом генетичної карти хромосоми *варіанта* 1912-4Crt виявлено, що його 2 *csIA/glxA/dtpA*-кластери організовані за різними схемами — один із кластерів містить вставку у 2 гени. Виявлена відмінність в організації *csIA/glxA/dtpA*-кластерів мутанта *S. globisporus* 1912-4Crt має особливе значення на тлі того, що аналогічні кластери в геномі спорідненого штаму *S. griseus* NBRC 13350 мають одну схему організації, а в геномі *S. coelicolor* A3(2) наявний тільки один аналогічний кластер.

Ключові слова: стрептоміцет, пелета, нуклеотидна послідовність, кластер, ген, показники подібності.

Цитування: Поліщук Л.В., Бамбура О.І., Лук'янчук В.В. Детермінація формування пелет у штаму *Streptomyces globisporus* 1912-4Crt. *Фізіологія рослин і генетика*. 2024. 56, № 4. С. 333–342. <https://doi.org/10.15407/frg2024.04.333>

Рід *Streptomyces* — це велика група грампозитивних мікроорганізмів, що характеризуються складним циклом розвитку. Мікроорганізми роду *Streptomyces* розвиваються від гіллястих гіфів до килимка міцелію і, нарешті, повітряних гілок зі споровими ланцюгами, проходячи складний життєвий цикл [1–3]. Стрептоміцети при культивуванні в рідкому середовищі ростуть у вигляді міцеліальних мереж, що зазвичай формують великі гранули або грудки (пелети) (рис. 1). Як приклад стрептоміцетів, що утворюють пелети, можна навести види *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. albus*, *S. griseus*, *S. hygrosopicus* і *S. avermitilis* [4, 5].

При вирощуванні в рідині гіфи агрегуються в щільні гранули міцелію завдяки наявності клейкого позаклітинного матриксу, що складається з великої кількості різноманітних полімерів (включно з полісахаридами, білками, органічними й нуклеїновими кислотами) [7, 8] (рис. 2). Два з цих полімерів (глікани) охарактеризовані як ключові елементи для формування гранул: полі- β -1,6-N-ацетилглюкозамін і целюлозоподібний глікан [6, 9]. Встановлено, що гомополісахариди глікани синтезуються конститутивно [9].

Ці глікани синтезуються ферментами, що кодується генами *mat*-кластера (полі- β -1,6-N-ацетилглюкозамін) і *cslA/glxA/dtpA* кластера (целюлозоподібний глікан) (рис. 3).

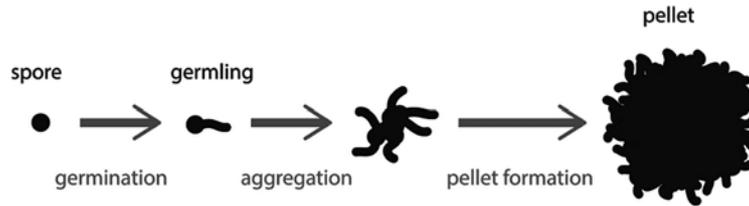


Рис. 1. Процес утворення пелет міцелієм *S. coelicolor* A3(2) в рідкому середовищі [6]

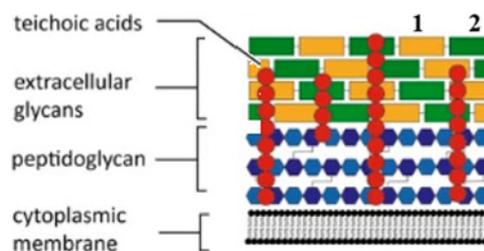


Рис. 2. Схематична модель будови клітинної стінки гіфів у пелетах *S. coelicolor* [6]:

1 — полі- β -1,6-N-ацетилглюкозамін; 2 — целюлозоподібний глікан



Рис. 3. Організація *mat*-кластера (а) та *cslA/glxA/dtpA* кластера (б) штаму *S. coelicolor* A3(2) (за інформацією з баз даних NCBI і KEGG)

Нездатність мутантів *S. lividans* 1326 і *S. coelicolor* A3(2) синтезувати ці глікани унеможливило утворення гранул і призводить до утворення міцелію з матоподібною морфологією [5, 8, 10].

Повідомлено, що близько двох третин усіх досліджених геномів *Streptomyces* (наприклад, *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. albus*, *S. griseus*, *S. hygroscopicus* і *S. avermitilis*) містять гени *mat*-кластера, тоді як оперон *cslA/glxA* виявлено у всіх аналізованих стрептоміцетних геномах [4, 9].

Завдяки здатності синтезувати різні за хімічною природою метаболіти, стрептоміцети є важливою групою біотехнологічних бактерій — вони продукують широкий спектр антибіотиків, що застосовуються в медицині й ветеринарії, та інших біологічно активних сполук (ферментів, регуляторів, вітамінів) [11, 12]. Наприклад, *wild type S. globisporus* 1912 та його варіанти продукують біологічно активні метаболіти такі, як протираковий антибіотик ландоміцини E, каротиноїди бета-каротин і лікопін [13].

Встановлено, що формування пелет впливає на синтез вторинних метаболітів — і зв'язок між обома процесами переважно негативний [9, 11]. Таке значення морфології міцелію при культивуванні в біореакторах пояснюють тим, що в пелетах менше забезпечення поживними речовинами і повітрям клітин всередині утворення [4]. У зв'язку з впливом агрегації гіфів на ефективність мікробіологічного виробництва, в багатьох лабораторіях проводиться активне вивчення впливу як умов вирощування, так і генетичної детермінації на морфологію міцелію стрептоміцетів за глибинного культивування [7, 14].

Мета роботи — визначити наявність в геномі *wild type* штаму *S. globisporus* 1912 генів, продукти яких забезпечують агрегацію гіфів у пелети.

Методика

Штам *S. globisporus* 1912 був виділений зі зразка ґрунту Вірменії та зберігається в Українській колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України [http://www.imv.kiev.ua/images/doc/catalog/UCM_catalog.pdf]. У даного штаму отримано ряд спонтанних та індукованих варіантів, у тому числі й мутанти *S. globisporus* 1912-4Crt та *S. globisporus* 1912-2 [13]. Варіант 1912-4Crt є спонтанним мутантом *S. globisporus* 1912, що продукує бета-каротин і лікопін. Мутант *S. globisporus* 1912-2 отримано за дії нітрозогуанідину; він характеризується зменшеним синтезом ландоміцину E. Секвенування ДНК проводили в BaseClear B.V. (Лейден, Нідерланди) за технологією Illumina. Нуклеотидна послідовність геномної ДНК мутанта *S. globisporus* 1912-4Crt представлена в базах даних NCBI (доступ QWFA00000000.1, GenBank) у вигляді 466 контигів різних молекулярних розмірів, які в сумі становлять 7,4 Мпн. Нуклеотидна послідовність геномної ДНК *S. globisporus* 1912-2 отримана у вигляді 1438 контигів різних молекулярних розмірів, які в сумі становлять 7,2 Мпн (не представлена в базах даних NCBI). Молекулярні розміри контигів мутанта 1912-2 становили від 358 (Contig_1421) до 75588 пн (Contig_2), а розміри контигів варіанта 1912-4Crt варіювали від 306 (QWFA01000466.1) до 124967 пн (QWFA01000001.1).

Для отримання міцелію спори стрептоміцету вносили в середовище Оканіші й культивували з перемішуванням (240 об/хв) за температури 28 °С упродовж 3 діб [15].

У роботі користувалися інформацією із загальнодоступних Інтернет даних GenBank сервера NCBI (National Center for Biotechnology Information) [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]. Вирівнювання послідовностей проводилося із застосуванням пакета програм BLASTN (discontiguous megablast) з цього ж сервера [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi]. Базові налаштування програми BLAST — без змін. В якості запитів (Query) використовували послідовності генів штаму *S. coelicolor* A3(2) та *S. griseus* NBRC 13350 (табл. 1).

Результати та обговорення

Оскільки при культивуванні *wild type* штаму *S. globisporus* 1912 і низки його похідних (зокрема й варіантів 1912-4Crt та 1912-2) у рідкому середовищі міцелій формує пелети, то очікували наявність в їх хромосомі принаймні одного з кластерів, продукти генів яких забезпечують цей процес (рис. 4). Таке очікування базується на встановленому факті, що у формуванні пелет у стрептоміцетів ключову роль відіграють метаболіти, синтез яких детермінується 2 кластерами генів [4]. Однак, на відміну від *mat*-кластера, *cslA/glxA/dtpA*-кластер виявлено в геномах усіх досліджених стрептоміцетів [9].

Насамперед було проведено пошук у геномних послідовностях обох варіантів *S. globisporus* 1912 кластерів агрегації міцелію (*mat*- і *cslA/glxA/dtpA*-кластерів).

Процес агрегації міцелію за глибинної культивації серед стрептоміцетів найбільш досліджено в штамів *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* 1326 і *S. griseus* NBRC 13350. Тому в біоінформативних дослідженнях сиквенсів хромосом стрептоміцетів як запити були використані пос-

ТАБЛИЦЯ 1. Гени *mat*- та *cslA/glxA/dtpA*-кластерів, які використано як запити в BLASTN-аналізі

Гени кластерів штамів стрептоміцетів		Протеїни, що кодуються генами
<i>S. coelicolor</i> A3(2) NC_003888.3 *	<i>S. griseus</i> NBRC 13350 AP009493 *	
Гени <i>mat</i> -кластерів		
SCO2961	SGR_4574	Acyltransferase
SCO2962 (<i>matB</i>)	SGR_4573	Glycosyltransferase
SCO2963 (<i>matA</i>)	SGR_4572	Membrane protein
SCO2964	SGR_4571	LysR family transcriptional regulator
Гени <i>cslA/glxA/dtpA</i> кластерів		
SCO2836 (<i>cslA</i>)	SGR_4704	Glycosyltransferase
SCO2837 (<i>glxA</i>)	SGR_4703	Secreted protein
SCO2838 (<i>dtpA</i>)	SGR_4702	Secreted endoglucanase

* Номер доступу в базі даних GenBank (NCBI).

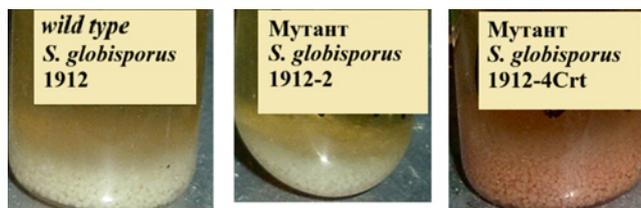


Рис. 4. Пелети, сформовані міцелієм вихідної культури *S. globisporus* 1912 та його мутантами



Рис. 5. Гени *S. globisporus* 1912-4Crt, які складають *csIA/glxA/dtpA*-кластери:

А — кластер, який локалізований на контигу QWFA01000144.1; Б — кластер, який локалізований на контигу QWFA01000051.1. У сірий колір забарвлено додаткові гени

ТАБЛИЦЯ 2. Контиги послідовностей хромосом варіантів штаму *S. globisporus* 1912, на яких розташовані кластери формування пелет

Локалізація кластерів утворення пелет варіантів штаму <i>S. globisporus</i> 1912	
Варіант <i>S. globisporus</i> 1912-4Crt	Варіант <i>S. globisporus</i> 1912-2
<i>mat</i> -кластер	
QWFA01000032.1 (24808 пн — 30002 пн)	Contig_390 (2563 пн — 6148 пн) * Contig_1067 (1 пн — 1230 пн) Contig_1200 (489 пн — 849 пн)
<i>csIA/glxA/dtpA</i> -кластери	
QWFA01000144.1 (7051 пн — 10107 пн)	Contig_580 (307 пн — 3363 пн)
QWFA01000051.1 (10113 пн — 16859 пн)	Contig_441 (1 пн — 1752 пн) * Contig_706 (1 пн — 2161 пн) Contig_721 (1 пн — 2859 пн)

* Послідовність кластера розташована на трьох контигах варіанта *S. globisporus* 1912-2.

лідовності генів штамів *S. coelicolor* A3(2) й *S. griseus* NBRC 13350, які наведені в табл. 1. У результаті аналізу в геномі кожного варіанта *S. globisporus* 1912 виявлено локуси обох кластерів (табл. 2). Однак, якщо *mat*-кластер представлений в одному екземплярі на хромосому, то по два *csIA/glxA/dtpA*-кластери виявлено в хромосомах обох мутантів (див. табл. 2).

Попарним вирівнюванням послідовностей аналогічних кластерів двох варіантів встановлено повну їх ідентичність. Наприклад, послідовність *csIA/glxA/dtpA*-кластера, що локалізований на контигу QWFA01000051.1 (*S. globisporus* 1912-4Crt), має показник подібності Qc=100 %, I=100 % структурам контигів Contig_441, Contig_706 і Contig_721 (*S. globisporus* 1912-2).

Оскільки було анотовано лише послідовність генома варіанта *S. globisporus* 1912-4Crt, аналізували тільки його генетичну карту. Аналізом генетичної карти/анотації хромосоми варіанта *S. globisporus* 1912-4Crt виявлено, що його 2 *csIA/glxA/dtpA*-кластери організовані за різ-

ними схемами (рис. 5). Кластер, локалізований на контигу QWFA01000051.1, має вставку (2 додаткових гени) між генами кластера D3105_12050 і D3105_12065.

Аналіз подібності послідовностей аналогічних (функціональних) генів 2 *csIA csIA glxA*-кластерів встановив, що кластери відрізняються не тільки схемою організації, а й послідовністю ДНК генів (табл. 3).

У літературних джерелах повідомляється про використання в дослідженнях інформації про кластери агрегації штамів *S. coelicolor* A3(2) і *S. griseus* NBRC 13350, що наведені в табл. 1 [16, 17].

Було вирішено дослідити наявність у хромосомах цих штамів додаткових генів чи кластерів агрегації. Так, у хромосомі штаму *S. coelicolor* A3(2) виявлено 2 гени, аналогічні генам *mat*-кластера: SCO4555 (аналогічний SCO2961) і SCO4554 (аналогічний SCO2962). Показники подібності їх структур і послідовності 2 генів *mat*-кластера становили $Q_c=74\%$, $I=78,3\%$.

Згідно з літературними джерелами, переважна більшість геномів (89,2 %) досліджених штамів містили по одному *csIA/glxA/dtpA* кластеру, винятками були штами *S. roseosporus* NRRL15998, *S. albus* NBRC 13350 і *S. griseus* NBRC 13350 [17]. Один кластер у геномі *S. griseus* NBRC 13350 формують гени *SGR_4704*, *SGR_4703*, *SGR_4702*, а другий утворюють гени *SGR_2125*, *SGR_2126*, *SGR_2127*. Обидва кластери організовані за однією схемою. Встановлено, що показники подібності їхніх структур становлять $Q_c=78\%$, $I=78,9\%$. Показники подібності послідовностей генів двох *csIA/glxA/dtpA*-кластерів варіанта *S. globisporus* 1912-4Crt становлять $Q_c=80\%$, $I=72,8\%$. Також встановлено, що в *csIA/glxA/dtpA* кластерах кількох досліджених стрептоміцетів (*S. sp.* SPB7, *S. roseosporus* NRRL15998, *S. viridochromogenes* DSM40736) містилися інсерції [17].

Визначені послідовності варіантів *S. globisporus* 1912 становлять 7,2 Мпн (варіант *S. globisporus* 1912-2) й 7,4 Мпн (варіант *S. globisporus* 1912-4Crt). Ми припускаємо, що сиквеновані послідовності варіантів становлять 85–90 % дійсного молекулярного розміру хромосоми штаму *S. globisporus* 1912. Вирівнювання первинних структур тотальної ДНК варіантів *S. globisporus* 1912-2 й *S. globisporus* 1912-4Crt виявило, що вони ідентичні ($I=99,99\%$). Покриття гомологічних первинних структур (Query coverage) *S. globisporus* 1912-4Crt і *S. globisporus* 1912-2 становило 95 %. Встановлено, що деякі контиги мутантів (як *S. globisporus* 1912-2, так і *S. globisporus* 1912-4Crt) мали структуру

ТАБЛИЦЯ 3. Подібність первинних структур генів 2 *csIA/csIA/glxA*-кластерів *S. globisporus* 1912-4Crt

QWFA01000144.1 (Query Sequence)	QWFA01000051.1 (Subject Sequence)	Показники подібності сиквенсів аналогічних генів, %
D3105_24065	D3105_12070	$Q_c=62$ $I=79,2$ M/G =133/32
D3105_24060	D3105_12065	$Q_c=81$ $I=74,6$ M/G =399/0
D3105_24055	D3105_12050	$Q_c=66$ $I=82,7$ M/G =218/20

Примітка: Q_c (Query coverage) — покриття запиту (розмір послідовності Subject Sequence, що подібна до послідовності запиту Query Sequence), I (Identity) — подібність послідовностей.

частково або повністю не виявлену в послідовності іншого варіанта. Наприклад, послідовності понад 20 контигів мутанта *S. globisporus* 1912-4Crt не виявлені у варіанта *S. globisporus* 1912-2. Крім того, низка контигів обох мутантів була тільки частково відмінною. Як приклад таких структур можна навести контиги: Contig_4 й QWFA01000034 (Qc=54 %, I=99,96 %). Як було вже показано, взаємодоповнення визначених послідовностей ДНК варіантів *S. globisporus* 1912-2 й *S. globisporus* 1912-4Crt є корисним для встановлення структур кластерів *lnd*- і *crt*-генів [13].

Дослідження наявної інформації про структури геномних ДНК 2 варіантів *S. globisporus* 1912 (*S. globisporus* 1912-2 й *S. globisporus* 1912-4Crt) дало змогу підтвердити виявлену відмінність в організації *cslA/glxA/dtpA* кластерів штаму. Виявлена відмінність в організації *cslA/glxA/dtpA*-кластерів штаму *S. globisporus* 1912 має особливе значення на тлі того, що *cslA/glxA/dtpA*-кластери в геномі штаму *S. griseus* NBRC 13350 мають одну схему організації, а в геномі *S. coelicolor* A3(2) наявний тільки один *cslA/glxA/dtpA*-кластер. Необхідно мати на увазі, що вид *S. globisporus* належить до *S. griseus* клади [18, 19], тоді як штам *S. coelicolor* A3(2) не є близько спорідненим до стрептоміцетів з *S. griseus* клади і є членом *S. albidoflavus* клади.

Така кореляція свідчить про перспективність вивчення кластерів, продукти яких забезпечують формування пелет міцелію не тільки для збільшення продуктивності виробництва, а й для визначення еволюційних взаємин споріднених видів/штамів стрептоміцетів.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Zacchetti B., Smits P., Claessen D. Dynamics of pellet fragmentation and aggregation in liquid-grown cultures of *Streptomyces lividans*. *Front. Microbiol.* 2018. N 9. 943. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00943>
2. Petrus M.L., Claessen D. Pivotal roles for *Streptomyces* cell surface polymers in morphological differentiation, attachment and mycelial architecture. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2014. **106**, N 1. P. 127–139. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0157-9>
3. Petrus M.L., van Veluw G.J., Wösten H.A., Claessen D. Sorting of *Streptomyces* cell pellets using a complex object parametric analyzer and sorter. *J. Vis. Exp.* 2014. N 84. e51178. <https://doi.org/10.3791/51178>
4. van Dissel D., Claessen D., Roth M., van Wezel G.P. A novel locus for mycelial aggregation forms a gateway to improved *Streptomyces* cell factories. *Microb. Cell Fact.* 2015. **14**. e44. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0224-6>
5. Kumar P., Khushboo Rajput D., Dubey K.K. Insights into the mechanism of mycelium transformation of *Streptomyces toxytricini* into pellet. *FEMS Microbes.* 2023. N 4. xtad017. <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtad017>
6. Ultee E., van der Aart L.T., Zhang L., van Dissel D., Diebold C.A., van Wezel G.P., Claessen D., Briegel A. Teichoic acids anchor distinct cell wall lamellae in an apically growing bacterium. *Commun. Biol.* 2020. **3**, N 1. e314. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1038-6>
7. Vassallo A., Palazzotto E., Renzone G., Botta L., Faddetta T., Scaloni A., Puglia A.M., Gallo G. The *Streptomyces coelicolor* small ORF *trpM* stimulates growth and morphological development & exerts opposite effects on actinorhodin and calcium-dependent antibiotic production. *Front. Microbiol.* 2020. **11**. e224. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00224>
8. Wu Y., Kang Q., Zhang L.L., Bai L. Subtilisin-involved morphology engineering for improved antibiotic production in actinomycetes. *Biomolecules.* 2020. **10**, N 6. e851. <https://doi.org/10.3390/biom10060851>

9. Zacchetti B., Willemse J., Recter B., van Dissel D., van Wezel G.P., Wösten H.A., Claessen D. Aggregation of germlings is a major contributing factor towards mycelial heterogeneity of *Streptomyces*. *Sci. Rep.* 2016. N 6. e27045. <https://doi.org/10.1038/srep27045>
10. van Dissel D., Claessen D., van Wezel G.P. Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Adv. Appl. Microbiol.* 2014. **89**. P. 1–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00001-9>
11. Manteca Á., Yagüe, P. *Streptomyces* differentiation in liquid cultures as a trigger of secondary metabolism. *Antibiotics*. 2018. **7**, N 2. e41. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020041>
12. Khushboo Kumar P., Dubey K.K., Usmani Z., Sharma, M., Gupta V.K. Biotechnological and industrial applications of *Streptomyces* metabolites. *Biofuel. Bioprod. Biorefin.* 2022. **16**, N 1. P. 244–264. <https://doi.org/10.1002/bbb.2294>
13. Matselyukh B.P., Polishchuk L.V., Lukyanchuk V.V., Golembiowska S.L., Lavrenchuk V.Y. Sequences of landomycin E and carotenoid biosynthetic gene clusters, and molecular structure of transcriptional regulator of *Streptomyces globisporus* 1912. *Mikrobiol. Zh.* 2016. **78**, N 6. P. 60–70. <https://doi.org/10.15407/microbiolj78.06.060>
14. Hobbs G., Frazer C.M., Gardner D.C.J., Cullum J.A., Oliver S.G. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1989. **31**, N 3. P. 272–277. <https://doi.org/10.1007/bf00258408>
15. Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: cultural conditions and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* 1974. **80**, N 2. P. 389–400. <https://doi.org/10.1099/00221287-80-2-389>
16. Petrus M.L., Vijgenboom E., Chaplin A.K., Worrall J.A., van Wezel G.P., Claessen, D. The DyP-type peroxidase DtpA is a Tat-substrate required for GlxA maturation and morphogenesis in *Streptomyces*. *Open biology*. 2016. **6**, N 1. 150149. <https://doi.org/10.1098/rsob.150149>
17. Liman R., Facey P.D., van Keulen G., Dyson P.J., Del Sol, R. A laterally acquired galactose oxidase-like gene is required for aerial development during osmotic stress in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One*. 2013. **8**, N 1. E54112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054112>
18. Polishchuk L. Similarity and dissimilarity of primary structures of some *Streptomyces* spp. Genomes and the *Streptomyces globisporus* 1912-2 chromosomal DNA. *Bio. Cell*. 2017. **33**, N 3. P. 206–213. <https://doi.org/10.7124/bc.000952>
19. Полищук Л.В., Лукьянчук В.В. Определение близкородственных связей штамма *Streptomyces globisporus* 1912-2. *Микробиол. журн.* 2017. **79**, N. 4. С. 53–65. <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.04.053>

Отримано 23.05.2024

REFERENCES

1. Zacchetti, B., Smits, P. & Claessen, D. (2018). Dynamics of pellet fragmentation and aggregation in liquid-grown cultures of *Streptomyces lividans*. *Front. Microbiol.*, No. 9, 943. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00943>
2. Petrus, M.L. & Claessen, D. (2014). Pivotal roles for *Streptomyces* cell surface polymers in morphological differentiation, attachment and mycelial architecture. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, No. 1, pp. 127-139. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0157-9>
3. Petrus, M.L., van Veluw, G.J., Wösten, H.A. & Claessen, D. (2014). Sorting of *Streptomyces* cell pellets using a complex object parametric analyzer and sorter. *J. Vis. Exp.*, No. 84, e51178. <https://doi.org/10.3791/51178>
4. van Dissel, D., Claessen, D., Roth, M. & van Wezel, G.P. (2015). A novel locus for mycelial aggregation forms a gateway to improved *Streptomyces* cell factories. *Microb. Cell Fact.*, 14, e44. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0224-6>
5. Kumar, P., Khushboo, Rajput, D. & Dubey, K.K. (2023). Insights into the mechanism of mycelium transformation of *Streptomyces toxytricini* into pellet. *FEMS Microbes*, No. 4, xtad017. <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtad017>
6. Ultee, E., van der Aart, L.T., Zhang, L., van Dissel, D., Diebolder, C.A., van Wezel, G.P., Claessen, D. & Briegel, A. (2020). Teichoic acids anchor distinct cell wall lamel-

- lae in an apically growing bacterium. *Commun. Biol.*, 3, No. 1, e314. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1038-6>
7. Vassallo, A., Palazzotto, E., Renzone, G., Botta, L., Faddetta, T., Scaloni, A., Puglia, A.M. & Gallo, G. (2020). The *Streptomyces coelicolor* small ORT *trpM* stimulates growth and morphological development & exerts opposite effects on actinorhodin and calcium-dependent antibiotic production. *Front. Microbiol.*, 11, e224. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00224>
 8. Wu, Y., Kang, Q., Zhang, L.L. & Bai, L. (2020). Subtilisin-involved morphology engineering for improved antibiotic production in actinomycetes. *Biomolecules*, 10, No. 6, e851. <https://doi.org/10.3390/biom10060851>
 9. Zacchetti, B., Willemsse, J., Recter, B., van Dissel, D., van Wezel, G.P., Wösten, H.A. & Claessen, D. (2016). Aggregation of germlings is a major contributing factor towards mycelial heterogeneity of *Streptomyces*. *Sci. Rep.*, No. 6, e27045. <https://doi.org/10.1038/srep27045>
 10. van Dissel, D., Claessen, D. & van Wezel, G.P. (2014). Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Adv. Appl. Microbiol.*, 89, pp. 1-45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00001-9>
 11. Manteca, Á. & Yagüe, P. (2018). *Streptomyces* differentiation in liquid cultures as a trigger of secondary metabolism. *Antibiotics*, 7, No. 2, e41. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020041>
 12. Khushboo, Kumar, P., Dubey, K.K., Usmani, Z., Sharma, M. & Gupta, V.K. (2022). Biotechnological and industrial applications of *Streptomyces* metabolites. *Biofuel. Bioprod. Biorefin.* 16, No. 1, pp. 244-264. <https://doi.org/10.1002/bbb.2294>
 13. Matselyukh, B.P., Polishchuk, L.V., Lukyanchuk, V.V., Golembiovskaya, S.L. & Lavrenchuk, V.Y. (2016). Sequences of landomycin E and carotenoid biosynthetic gene clusters, and molecular structure of transcriptional regulator of *Streptomyces globisporus* 1912. *Mikrobiol. zhurn.*, 78, No. 6, pp. 60-70. <https://doi.org/10.15407/microbiolj78.06.060>
 14. Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Cullum, J.A. & Oliver, S.G. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, No. 3, pp. 272-277. <https://doi.org/10.1007/bf00258408>
 15. Okanishi, M., Suzuki, K. & Umezawa, H. (1974). Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: cultural conditions and morphological study. *J. Gen. Microbiol.*, 80, No. 2, pp. 389-400. <https://doi.org/10.1099/00221287-80-2-389>
 16. Petrus, M.L., Vijgenboom, E., Chaplin, A.K., Worrall, J.A., van Wezel, G.P. & Claessen, D. (2016). The DyP-type peroxidase DtpA is a Tat-substrate required for GlxA maturation and morphogenesis in *Streptomyces*. *Open Biol.*, 6, No. 1, 150149. <https://doi.org/10.1098/rsob.150149>
 17. Liman, R., Facey, P.D., van Keulen, G., Dyson, P.J. & Del Sol, R. (2013). A laterally acquired galactose oxidase-like gene is required for aerial development during osmotic stress in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One*, 8, No. 1, e54112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054112>
 18. Polishchuk, L. (2017). Similarity and dissimilarity of primary structures of some *Streptomyces* spp. genomes and the *Streptomyces globisporus* 1912-2 chromosomal DNA. *Bio. Cell*, 33, No. 3, pp. 206-213. <https://doi.org/10.7124/bc.000952>
 19. Polishchuk, L.V. & Lukyanchuk, V.V. (2017). Identification of consanguinity of the strain *Streptomyces globisporus* 1912-2. *Mikrobiol. zhurn.*, 79, No. 4, pp. 53-65. <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.04.053>

Received 23.05.2024

DETERMINATION OF PELLET FORMATION IN *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-4Crt*L.V. Polishchuk, O.I. Bambura, V.V. Lukyanchuk*

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine

154 Akademika Zabolotnogo St., Kyiv, 03143, Ukraine
e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

Streptomycetes are industrial producers of antibiotics, enzymes, vitamins. When streptomycetes are cultivated in the liquid medium of bioreactors, their mycelium forms pellets. Due to the influence of hyphae aggregation on the efficiency of microbiological production, the study of the influence of genetic determination of pellets formation in deep cultivation is an urgent task. The aim of the work is to determine the presence of genes in the genome of wild type strain *S. globisporus* 1912, whose products are necessary for the aggregation of hyphae into pellets. We analyzed the genomic sequences of 2 mutants (1912-4Crt and 1912-2) of *S. globisporus* 1912 strain. The 1912-4Crt variant is a spontaneous mutant of the original strain that began to produce carotenoids. The mutation of variant 1912-2 led to decrease in landomycin E synthesis. The genomic DNA sequence of *S. globisporus* 1912-4Crt is available in the GenBank database (accession QWFA00000000.1). The primary structure of the genomic DNA of variant 1912-2 is not placed in National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases. Sequences alignment was performed by BLASTN programs of the NCBI server. Streptomycete mycelium was grown in Okanishi's medium with stirring at a temperature of 28 °C for 3 days. During cultivation of the wild type strain *S. globisporus* 1912 and its mutants in a liquid medium, their mycelium forms pellets, so the presence of at least one of the indicated clusters in the chromosome was expected. Using BLASTN analysis in genomes of 2 *S. globisporus* 1912 variants, sequences similar to the structures of both mycelial aggregation clusters of the most researched strains *S. coelicolor* A3(2) and *S. griseus* NBRC 13350 were found. However, if the *mat*-cluster was represented in one cluster per chromosome of the mutant, then two *csIA/glxA/dtpA*-clusters were detected in the chromosomes of both variants (1912-4Crt and 1912-2). Analysis of genetic map of the chromosome of variant 1912-4Crt revealed that its 2 *csIA/glxA/dtpA* clusters are organized according to different schemes — one of the clusters contains an insertion in 2 genes. The revealed difference in the organization of the *csIA/glxA/dtpA* clusters of the strain *S. globisporus* 1912 is of particular importance against background of the fact that similar clusters in genome of related strain *S. griseus* NBRC 13350 have the same organization scheme, while in the genome of *S. coelicolor* A3(2) only one similar cluster is present.

Key words: streptomycete, pellet, nucleotide sequence, cluster, gene, similarity indicators.

ORCID

Л.В. ПОЛІЩУК — L.V. Polishchuk <https://orcid.org/0000-0002-3159-5022>

В.В. ЛУК'ЯНЧУК — V.V. Lukyanchuk <https://orcid.org/0000-0002-2425-7826>

О.І. БАМБУРА — O.I. Bambura <https://orcid.org/0000-0005-8942-6802>