

РОМАН І. І.<sup>1</sup>, ПАРНІКОЗА І. Ю.<sup>2,3</sup>, СІРВАТКА В. Я.<sup>1</sup>, ФЕДОРЕНКО В. О.<sup>1</sup>,  
ГРОМИКО О. М.<sup>1✉</sup>

<sup>1</sup> Львівський національний університет ім. І. Франка,

Україна, 79000, м. Львів, вул. Університетська, 1, ORCID: 0000-0003-4449-739X, 0000-0003-1326-6206, 0000-0002-7672-1897, 0000-0002-8107-0128

<sup>2</sup> Антарктичний центр МОН України,

Україна, 01601, м. Київ, бульвар Т. Шевченка, 16, ORCID: 0000-0002-0490-8134

<sup>3</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 150, ORCID: 0000-0002-0490-8134

✉ [oleksandr.gromyko@lnu.edu.ua](mailto:oleksandr.gromyko@lnu.edu.ua)

## ВЛАСТИВОСТІ АКТИНОМІЦЕТІВ РИЗОСФЕРИ *COLOBANTHUS QUITENSIS* (KUNTH) BARTL. (О. БУТ, МОРСЬКА АНТАРКТИКА)

**Мета.** Дослідити біологічні властивості актиноміцетів ризосфери *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. та вивчити їхню здатність продукувати біологічно активні сполуки. **Методи.** Мікробіологічні (виділення, синтез біоактивних сполук), генетичні та генно-інженерні (виділення та аналіз сумарної ДНК, гелелектрофорез ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, секвенування ДНК), біоінформатичні (філогенетичний аналіз). **Результати.** Зі зразків ризосфери *C. quitensis* виділено 21 ізолят актиноміцетів. Половина ізолятів виявляли антагоністичні властивості хоча б до однієї з 17 тест-культур хвороботворних та фітопатогенних мікроорганізмів. Низка штамів поєднували як антибактерійні, так і антифунгальні активності. Більшість ізолятів (70-95 %) продукували протеази, амілази, целюлази, майже 42 % – нітратредуктази, 20-25 % – пектинази й ліпази, відповідно. **Висновки.** Створено та схарактеризовано колекцію антарктичних актиноміцетів, перспективних для оцінки їхнього метаболічного потенціалу як продуцентів антибіотиків.

**Ключові слова:** Антарктичні бактерії, антимікробна активність, продукція ензимів.

Актиноміцети, головно представники роду *Streptomyces*, є одним з основних об'єктів мікробних біотехнологій, що зумовлено їхнім лідерством у продукції більшості відомих на сьогодні природних антибіотиків. Хоча на ринку фармпрепаратів сьогодні є широкий спектр антибіотичних засобів, пошук нових речовин не втрачає актуальності. Необхідність в цьому продиктована постійним виникненням нових мультирезистентних форм збудників інфекційних захворювань та швидким їхнім поширенням. Зростання частоти виявлення уже описаних

природних сполук мікробного походження обумовлює інтерес до вивчення малозведаних, складно доступних та екстремальних біотопів, де ще зберігається висока ймовірність виявити нові природні продукти [5].

Антарктида характеризується екстремальними умовами навколишнього середовища, такими як періоди низьких температур, високого рівня УФ-випромінювання, дефіциту поживних речовин, води тощо. В таких умовах антарктична мікробіота сформувала унікальні механізми адаптації, які часто обумовлені продукцією антифризних та холодостійких білків [1]. Здатність адаптуватися обумовлює значне різноманіття мікроорганізмів в антарктичному регіоні в т. ч. актиноміцетів, описане головно шляхом метагеномного та біоінформатичного аналізу [6]. Конкурентне середовище в свою чергу, особливо на бідному субстраті, яким є антарктичні ґрунти, може сприяти продукції широкого спектра вторинних метаболітів, зокрема антибіотиків [9]. Відносно недавні дослідження показали потенціал антарктичних актиноміцетів як продуцентів антимікробних антибіотиків, в т. ч. нових, так і протипухлинних речовин [7]. Однак, наявна інформація про різноманіття антарктичних актиноміцетів, особливо тих, які вдається культивувати, та їхній метаболічний потенціал як продуцентів антибіотиків та інших біологічно активних речовин ще потребує значного доповнення.

У цьому дослідженні ми описуємо виділення та дослідження біологічних властивостей актиноміцетів ризосфери *Colobanthus quitensis* – однієї з двох ендемічних рослин, поширених у прибережній зоні антарктичних островів.

© РОМАН І. І., ПАРНІКОЗА І. Ю., СІРВАТКА В. Я., ФЕДОРЕНКО В. О., ГРОМИКО О. М.

### Матеріали і методи

Зразки ризосфери *C. quitensis* зібрані у 2021 році в північній частині о. Бут (Порт Шарко), що розташований в північно-східній частині архіпелагу Вільгельма. Зберігали в стерильних пакетах з пергаменту за температури 4°C до подальшого використання. Актиноміцети виділяли прямим висіванням як описано в [11]. Отримані чисті культури зберігали в середовищі TSB (HiMedia) з додаванням рівного об'єму 50 % розчину гліцеролу, за температури – 86°C.

Для виділення ДНК штами вирощували протягом 3-5 днів (в залежності від швидкості росту культур) в 10 мл середовища TSB при 28°C та 180 об/хв. Геному ДНК виділяли методом як описано раніше [11]. ПЛР-продукти отримані під час реакції очищали з агарозного гелю використовуючи QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Нідерланди). Очищені ПЛР-продукти гена 16S рДНК секвенували використовуючи метод Сенджера в компанії GATC (Німеччина). Форвард і реверс послідовності були зібрані за допомогою програми Geneious версія 9.1.3, як матрицю для складання послідовностей використали послідовність гена 16S рРНК *Streptomyces coelicolor* A3(2) (NC\_003888.3:4530650-4532177).

Аналіз послідовності гена 16s рРНК ізолятів з використанням баз даних Національного Біотехнологічного Інформаційного Центру (NCBI) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Нуклеотидні послідовності вирівнювали за алгоритмом MUSCLE [2]. Філогенетичне дерево будували в програмі MEGA X [10] з використанням алгоритму об'єднання сусідів (NJ). Ген 16s рРНК *Escherichia coli* KCTC 2441 (EU014689.1) було використано для закорінення філогенетичного дерева.

Актиноміцетні ізоляти висівали уколом по 6 штамів на чашки Петрі з середовищами ISP2 і DNPM. На 7 добу росту колонії, що утворилися, заливали середовищем LB із 0,7 % агару, яке містило 10<sup>9</sup> клітин/мл тест-культур бактерій або середовищем Сабуро з 0,7 % агару, яке містило стільки ж клітин/мл тест-культур дріжджів. Інкубували в термостаті при 37 °С протягом 24 год. Оцінку здійснювали візуально за утворенням зон затримки росту тест-культур [4].

Для дослідження ензиматичних активностей штами висівали уколом на селективні середовища по 6 культур на чашку Петрі та культивували 6 діб. Пектинолітичну активність визначали на середовищі з пектином, зони лізису

детектували після заливання 1 % р-ном бромиду гексадецилтриметиламонію. Амїлолітичну та целюлозолітичну активності визначали на середовищі з крохмалем та карбоксиметилцелюлозою відповідно, детекцію проводили після заливки розчином Люголя та появи зон просвітління біля активних штамів. Здатність відновлювати нітрати визначали на середовищі з натрій нітратом, детекцію проводили з використання реактиву Гріса (10 г розчиняють в 100 мл 12 % оцтової кислоти), який з нітритами утворює діазосполуку рожевого кольору. Ліпазну активність визначали на середовищі з Tween-20, який за дії ферментів метаболізувався до вільних жирних кислот. Поява осаду кальцієвих солей жирних кислот вказувала на ліпазну активність. Лаказну та оксидоредуктазну активності визначали на середовищах з гваяколом та Azur В відповідно, активні штами змінювали забарвлення середовища навколо себе на коричневе (лаказна активність) та жовте (оксидоредуктазна активність). Протеїназну активність визначали на середовищі з сухим молоком, поява зон просвітління навколо колоній вказувала на протеїназну активність [4].

### Результати та обговорення

#### Виділення та культурально-морфологічні особливості ізолятів актиноміцетів ризосфери *C. quitensis*

Зі зразків ризосфери *C. quitensis* застосовуючи прямий посів водних суспензій, обробку фенолом та прогрівання з подальшим висівом суспензій в розведеннях 10<sup>-1</sup>-10<sup>-3</sup> на агаризовані поживні середовища виділили 21 ізолят, з характерними для актиноміцетів особливостями росту – форма і забарвлення колоній, здатність до утворення повітряного міцелію, утворення розчинних пігментів. Найбільшу кількість ізолятів було виділено після прямого посіву на середовища ISP-2 та HVA. За результатами філогенетичного аналізу ізолятів було встановлено, що ізоляти належать до родів *Streptomyces*, *Micromonospora* та *Amycolatopsis*. Найменше філогенетичне різноманіття мали представники роду *Micromonospora*, оскільки всі ізоляти групували в одну кладу, та були найбільш наближені до *Micromonospora zamorensis* CR38T. Ізолят *Amycolatopsis* Cq 72-27 утворював спільну кладу з *Amycolatopsis saalfeldensis* 2406-001. Представники роду *Streptomyces* утворюють три класи, які групуються з *Streptomyces brevispora* BK160T, *S. avidinii* NBRC 13429 та *S. fildesensis* GW25-5 (рис. 1.)

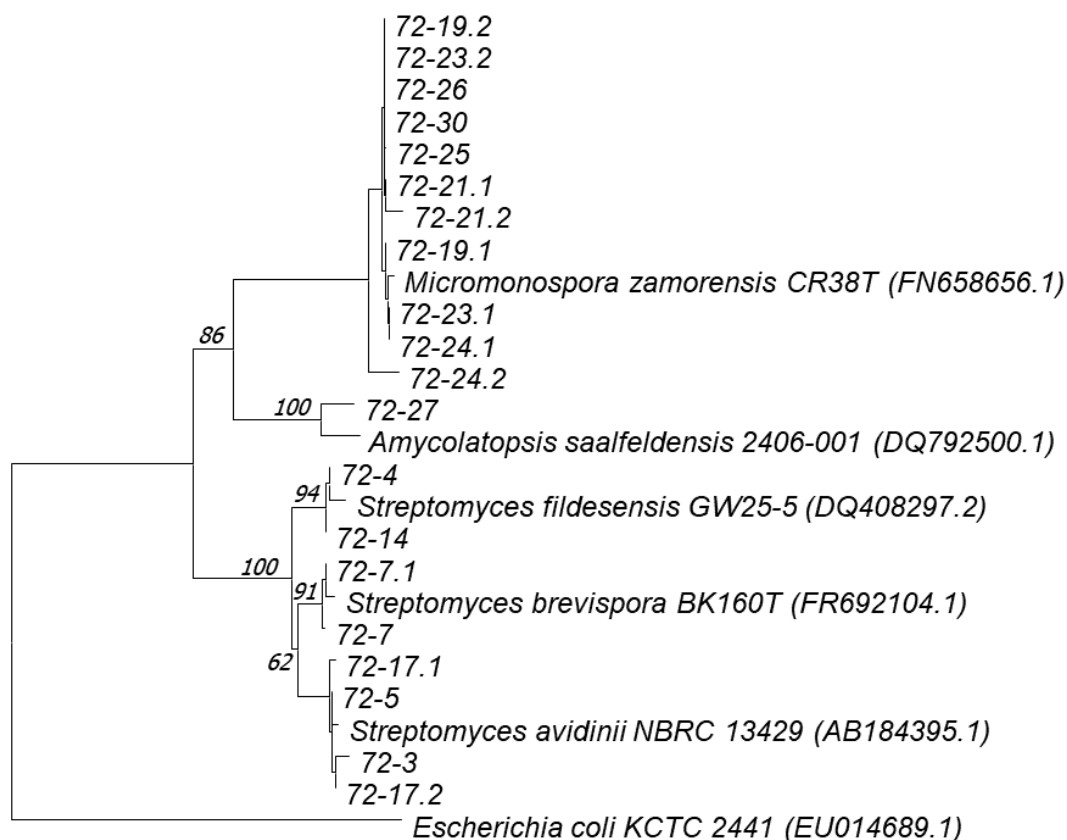


Рис. 1. Філогенетична характеристика ізолятів ризосфери *S. quitensis*. Послідовність 16 рПНК *Escherichia coli* KCTC 2441 використано для закорінення дерева.

Досліджувані ізоляти могли рости за температури від +15 до +28°C, проте представники роду *Streptomyces*, могли рости за температури +4°C, тоді як представники роду *Micromonospora* – за температури +37°C. Також для представників роду *Micromonospora* було характерним відсутність росту за присутності в середовищі NaCl.

#### Антимікробні властивості ізолятів актиноміцетів ризосфери *S. quitensis*

Одним з методів оцінки здатності мікроорганізмів до продукування біологічно активних речовин є дослідження їхніх антагоністичних властивостей. Досліджено антагоністичні властивості ізолятів актинобактерій ризосфери *S. quitensis* щодо широкого кола хвороботворних для людини та фітопатогенних мікроорганізмів (рис. 2).

Низка досліджуваних ізолятів були здатні пригнічувати грам-позитивні бактерії *B. subtilis* (4,8 %). Майже чверть штамів затримували ріст *M. smegmatis* (23,8 %). Проти інших бактерій, здатних спричиняти інфекції у людини антагоністів ми не виявили. Антифунгальну актив-

ність проти *C. albicans* виявляло 9,5 % ізолятів, ці ж штами пригнічували ріст мультирезистентного штаму *C. albicans* 12. Досліджувані ізоляти також виявляли антагоністичні властивості проти фітопатогенної мікробіоти. Зокрема, 4,8 % штамів затримували ріст *P. syringae*, а 9,5 % – *A. alternate*. Значно більше ми виявили антагоністів проти *X. campestris* (23,8 %) та *E. amylovora* (28,6 %). Значна частка ізолятів продукували антифунгальні сполуки проти фітопатогенних грибів. Майже 43 % затримували ріст *A. alternata*, 38,1 і 33,3 % були антагоністами *F. oxysporum* і *A. niger*, відповідно. Продукція антифунгальних сполук у більшій частині ізолятів може бути пов'язана з великою кількістю грибів, які ми виявляли у ризосфері *S. quitensis*, що очевидно зумовлює конкуренцію за джерела живлення, постачальником яких зокрема є кореневий ексудат рослин-симбіонтів. Жодний представник роду *Micromonospora* не продукували антибактерійний чи фунгіцидних сполук. Це може бути пов'язано зі складними механізмами регуляції вторинного метаболізму в представників цього роду [3].

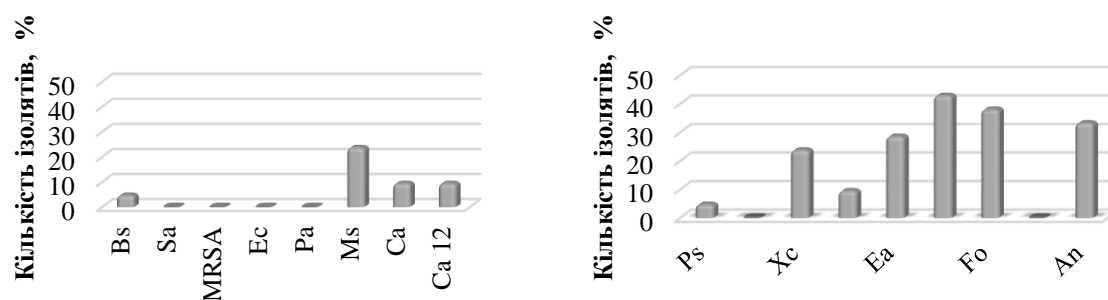


Рис. 2. Антимікробна активність ізолятів ризосфери *C. quitensis* проти хвороботворних для людини (зліва) та фітопатогенних (справа) мікроорганізмів. Bs – *B. subtilis* ATCC 31324, Sa – *S. aureus* ATCC 25923, MRSA – мультирезистентний штам *S. aureus* 120, Ec – *E. coli* ATCC 25922, Pa – *P. aeruginosa* ATCC 9027, Ms – *M. smegmatis* DSM 43286, Ca – *C. albicans* ATCC 885-653, Ca 12 – мультирезистентний штам *C. albicans* 12, Ps – *P. syringae* IMB 8511, Pc – *P. carotovorum* IMB 8982, Xc – *Xantomonas campestris* pv. *campestris* IMB8003, At – *A. tumefaciens* IMB 8628, Ea – *E. amylovora* Mi2, Aa – *Alternaria alternata* DSM 1102, Fo – *F. oxysporum* IMB 54201, Bc – *Botrytis cinerea* IMB 2306, An – *Aspergillus niger* IMB 16706.

### Ферментативні властивості актинобактерій ризосфери *C. quitensis*

Актинобактерії можуть продукувати широкий спектр ферментів, що забезпечує їхню здатність до виживання у край несприятливих умовах, зокрема на дуже складних для деструкції субстратах. Така властивість цих мікроорганізмів є одним з інструментів взаємодії з рослинами, а також зумовлює їхню важливу екологічно роль як деструкторів складних природних і синтетичних полімерів. Людство давно і широко застосовує у своїй життєдіяльності екзоферменти мікробного походження. Великий попит мають позаклітинні гідролази (амілази, пектинази, протеази, ліпази, целюлази та інші), які залучені в головних процесах обміну речовин в навколишньому середовищі та в клітинах живих організмів [8]. Ці ферменти використовують в сільському господарстві, в переробці відходів органічної та неорганічної продукції, в харчовій, медичній, текстильній, деревообробній промисловостях, при виробництві миючих засобів тощо.

Ми дослідили здатність антарктичних актиноміцетів продукувати екзоферменти (рис. 3). Для більшості досліджених ізолятів властива протеолітична (95,8 %), амілолітична (83,3 %) й целюлозолітична (70 %) активності. Понад 40 % штамів були здатні до нітратредукції. Від 21 до 25 % актиноміцетів продукували пектина-

зи й ліпази, відповідно. Найменше ізолятів виявляло лецитазну активність (8,3 %). Більшість досліджених ізолятів виявляли широкий спектр ензиматичних активностей. Хоча у деяких з них, наприклад у Cq 72-5, детектували лише здатність продукувати амілолітичні ферменти.

### Висновки

У результаті дослідження ризосфери *C. quitensis* було виділено 21 ізолят актиноміцетів, які належали до родів *Streptomyces*, *Micromonospora* та *Amycolatopsis*, з характерними для них особливостями росту та філогенетичними характеристиками. Серед них було ідентифіковано антагоністів фітопатогенних бактерій та грибів, а також антагоністів бактерії *B. subtilis*, *M. smegmatis* та *C. albicans*. Крім того, актинобактерії є важливими мікроорганізмами, які можуть виробляти широкий спектр ферментів, що має велике значення у багатьох промислових галузях. Дослідження показали, що антарктичні актиноміцети також мають високий потенціал до продукції ензимів, зокрема протеолітичних, амілолітичних і целюлозолітичних. Подальше дослідження антарктичних актинобактерій дозволить розкрити перспективи використання штамів у фармацевтичній та харчовій галузях.

Дослідження частково профінансовані грантом НАНЦ України № Н/04-2021.

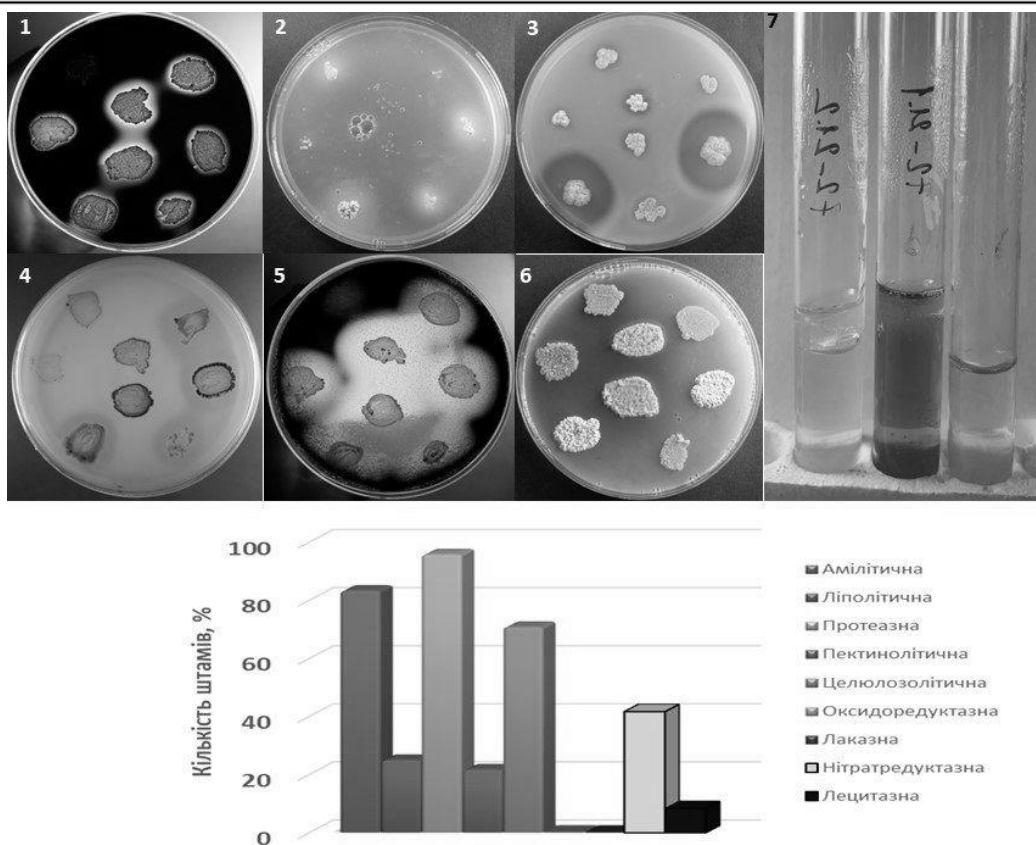


Рис. 3. Ферментативні активності актинобактерій ризосфери *C. quitensis*: 1 – амлілітична, 2 – ліполітична, 3 – протеазна, 4 – пектинолітична, 5 – целюлозолітична, 6 – нітратредуктазна, 7 – лецитазна.

## References

- Baskaran A., Kaari M., Venugopal G., Manikkam R., Joseph J., Bhaskar P. V. Anti freeze proteins (Afp): Properties, sources and applications – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Vol. 189. P. 292–305. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.105.
- Edgar R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*. 2004. 32 (5). P. 1792–1797.
- Gavriliidou A., Kautsar S. A., Zaburannyi N., Krug D., Müller R., Medema M. H., Ziemert N. Compendium of specialized metabolite biosynthetic diversity encoded in bacterial genomes. *Nature microbiology*. 2022. 7 (5). P. 726–735.
- Gromyko O., Tistechok S., Roman I., Aravitska O., Luzhetskyy A., Parnikoza I., Fedorenko V. Isolation and characterization of culturable actinobacteria associated with *Polytrichum strictum* (Galindez Island, the maritime Antarctic). *Ukrainian Antarctic Journal*. 2021. Vol. (1). P. 82–97. doi: 10.33275/1727-7485.1.2021.668.
- Hui M. L. Y., Tan L. T. H., Letchumanan V., He Y. W., Fang C. M., Chan K. G., Lee L. H. The extremophilic actinobacteria: From microbes to medicine. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10 (6). P. 682. doi: 10.3390/antibiotics10060682.
- Jurelevicius D., Pereira R. D. S., da Mota F. F., Cury J. C., de Oliveira I. C., Rosado A. S., Seldin L. Metagenomic analysis of microbial communities across a transect from low to highly hydrocarbon- contaminated soils in King George Island, Maritime Antarctica. *Geobiology*. 2022. Vol. 20 (1). P. 98–111. doi: 10.1111/gbi.12472.
- Núñez-Montero K., Barrientos L. Advances in Antarctic research for antimicrobial discovery: a comprehensive narrative review of bacteria from Antarctic environments as potential sources of novel antibiotic compounds against human pathogens and microorganisms of industrial importance. *Antibiotics*. 2018. Vol. 7 (4). P. 90. doi: 10.3390/antibiotics7040090.
- Salwan R., Sharma V. The role of actinobacteria in the production of industrial enzymes. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Elsevier, 2018. P. 165–177.
- Silva T. R., Duarte A. W., Passarini M. R., Ruiz A. L. T., Franco C. H., Moraes C. B., ... Oliveira V. M. Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. *Polar Biology*. 2018. Vol. 41. P. 1505–1519. doi: 10.1007/s00300-018-2300-y.
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA 11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*. 2021. 38 (7). P. 3022–3027.
- Tistechok S., Roman I., Fedorenko V., Luzhetskyy A., Gromyko O. Diversity and bioactive potential of Actinomycetia from the rhizosphere soil of *Juniperus excelsa*. *Folia Microbiologica*. 2023. P. 1–9.

ROMAN I. I.<sup>1</sup>, PARNIKOZA I. Y.<sup>2,3</sup>, SYRVATKA V. Y.<sup>1</sup>, FEDORENKO V. O.<sup>1</sup>, GROMYKO O. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ivan Franko National University of Lviv,  
Ukraine, 79005, Lviv

<sup>2</sup> State Institution National Antarctic Scientific Center, Ministry of Education and Science of Ukraine,  
Ukraine, 01601, Kyiv

<sup>3</sup> Institute of Molecular Biology and Genetic NAS of Ukraine,  
Ukraine, 03143, Kyiv

**PROPERTIES OF ACTINOMYCETES FROM THE RHIZOSPHERE OF *COLOBANTHUS QUITENSIS* (KUNTH) BARTL. (BOOTH ISLAND, MARITIME ANTARCTICA)**

**Aim.** Investigate the biological properties of actinomycetes from the rhizosphere of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. and study their ability to produce bioactive compounds. **Methods.** Microbiological (isolation, synthesis of bioactive compounds), genetic and genetic engineering (isolation and analysis of total DNA, DNA gel electrophoresis, polymerase chain reaction, DNA sequencing), bioinformatic (phylogenetic analysis) methods. **Results.** 21 actinomycete isolates were obtained from the samples of *C. quitensis* rhizosphere. Half of the isolates exhibited antagonistic properties towards at least one of 17 test cultures of pathogenic and phytopathogenic microorganisms. Some strains exhibited both antibacterial and antifungal activities. The majority of isolates (70-95 %) produced proteases, amylases, cellulases, almost 42 % – nitrate reductases, 20-25 % – pectinases and lipases, respectively. **Conclusions.** A collection of Antarctic actinomycetes has been created and characterized, which is promising for evaluating their metabolic potential as producers of antibiotics.

**Keywords:** Antarctic bacteria, antimicrobial activity, enzyme production.