DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2022.3(56).268585

УДК 579.873.71 : 579.264

І.В. Страшнова, К.С. Потапенко, Н.В. Коротаєва, Г.В. Лісютін, І.П. Метеліцина

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: fabiyanska@ukr.net

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЧОРНОМОРСЬКИХ СТРЕПТОМІЦЕТІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ОБРОСТАНЬ ЧЕРЕПАШНИКУ І МІДІЙ

Швидке набуття резистентності бактеріальними і грибковими патогенами є серйозною проблемою в системі охорони здоров'я, що зумовлює пошук в різних екологічних нішах нових перспективних продуцентів протимікробних природних продуктів. ***Мета.*** *Визначити антагоністичну активність стрептоміцетів, виділених із біологічних обростань природного черепашнику і мідій Одеської затоки Чорного моря.* ***Методи.*** *Досліджено антагоністичну активність 19 і 14 штамів стрептоміцетів, виділених, відповідно, із обростань черепашнику і мідій Одеської затоки. Стрептоміцети попередньо культивували на агаризованих середовищах Гаузе 1, Гаузе 2 і вівсяному агарі з морською сіллю (2%) при температурі 30 °С протягом 10 днів. Антагоністичну активність щодо 12 тест-культур визначали методом агарових блоків.* ***Результати.*** *Усі виділені морські стрептоміцети є антагоністами хоча б до одного штаму індикаторного мікроорганізму. Антибіотична активність залежала від джерела виділення стрептоміцетів, середовища культивування і властивостей конкретних штамів продуцентів і тест-культур. Найкращу активність штами стрептоміцетів із черепашнику проявили після культивування на середовищі Гаузе 1, а стрептоміцети із мідій – після культивування на середовищі Гаузе 2. Зони відсутності росту чутливих індикаторів коливалися від 12,4±0,3 мм до 20,6±0,2 мм (під впливом стрептоміцетів із черепашнику) і від 12,4±0,2 мм до 39,7±0,2 мм (під впливом стрептоміцетів із мідій). Streptomyces sp. Lim 2.2 (штам із черепашнику) пригнічував ріст 8-ми тест-культур, а штами із мідій Streptomyces spp. Myt 4b і Myt 7ch – 10-и. Найчутливішими до усіх стрептоміцетів були індикаторні штами грампозитивних бактерій, зокрема найбільше пригнічувався метаболітами Streptomyces spp. Myt 12a і Myt 12b штам Staphylococcus aureus ATCC 25923.* ***Висновки.*** *Антагоністична активність стрептоміцетів, ізольованих із Чорного моря, залежала від джерела виділення, середовища попереднього культивування і властивостей штамів продуцентів і індикаторних мікроорганізмів. Найбільшу активність штами стрептоміцетів із черепашнику і мідій проявили після попереднього культивування, відповідно, на середовищах Гаузе 1 і Гаузе 2 щодо грампозитивних бактерій. Найкращий антибіотичний потенціал виявлено у штамів Streptomyces spp. Lim 2.2, Lim 4, Lim 5.1 і Lim 7.2, виділених із обростань черепашнику, і штамів Streptomyces spp. Myt 7b, Myt 7ch, Myt 12a і Myt 12b, виділених із мідій.*

Ключові слова: морські стрептоміцети, антагоністична активність, індикаторні мікроорганізми

© І.В. Страшнова, К.С. Потапенко, Н.В. Коротаєва, Г.В. Лісютін, І.П. Метеліцина, 2022

Впровадження антибіотиків породило великі сподівання щодо перспектив боротьби із хворобами, спричиненими патогенними мікроорганізмами [7]. З часом занадто широке, не завжди обґрунтоване і адекватне призначення антибіотиків призвело спочатку до появи антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів, а згодом і збільшення їх кількості, що, у свою чергу, сприяє поширенню інфекційних захворювань. Окрім цього масштабному розповсюдженню резистентності до антибіотиків сприяє антропогенна діяльність [28].

Швидке набуття резистентності бактеріальними і грибковими патогенами є серйозною проблемою в системі охорони здоров'я навіть розвинених країн [12]. З 2020 року Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) попереджає про дефіцит інноваційних антибіотиків та їх небезпеку при лікуванні інфекцій, що викликані стійкими до антибіотичних препаратів мікроорганізмами [13, 30, 31]. Тому для боротьби з постійною появою мультирезистентних патогенів існує критична і постійна потреба у відкритті нових протимікробних природних продуктів [12].

Основним джерелом отримання нових антибіотичних сполук залишаються мікроорганізми, більшість з яких це культурабельні представники філуму *Actinobacteria*, серед яких провідну роль відіграють ґрунтові актинобактерії роду *Streptomyces* (до 70% відомих антибіотиків є вторинними метаболітами стрептоміцетів) [8, 12, 18, 22]. Однак, за останні 20 років повторне відкриття раніше охарактеризованих антибіотиків і надлишковість штамів знизили інтерес до ґрунтових стрептоміцетів, як до джерела нових біоактивних сполук [11, 13]. Актинобактерії, мешканці морського середовища (морських відкладень, коралових рифів, безхребетних тощо), набули цінності завдяки своєму хеморізноманіттю, включаючи продукцію численних біоактивних вторинних метаболітів [10, 17], що залежить від їх середовища з екстремальними коливаннями тиску, солоності, світла і температури [14]. Було показано, що морські актинобактерії демонструють більш різноманітні та кращі властивості порівняно з наземними актинобактеріями щодо антибактеріальних, антигрибкових, антибіоплівкових, антикоагулянтних та противірусних ефектів [13, 24].

Метою роботи було визначити антагоністичну активність стрептоміцетів, виділених із біологічних обростань природного черепашнику і мідій Одеської затоки Чорного моря.

Матеріали і методи

У дослідженні використано штами актинобактерій, виділені із біологічних обростань природного черепашнику і мідій (*Mytilus galloprovincialis*), зібраних у червні–липні 2020 р. в Одеській затоці Чорного моря (м. Одеса, Україна, 46°27′01″N 30°46′14″E) [6, 9]. Виділені із обростань черепашнику (19 штамів) і мушлей мідій (14 штамів) актинобактерії за результатами порівняння жирнокислотних спектрів з використанням бібліотеки MIDISherlock (ACTIN 3.80) з різними індексами подібності були ідентифіковані як представники роду *Streptomyces* [5].

Для вивчення антагоністичної активності штами стрептоміцетів вирощували поверхнево на агаризованих середовищах Гаузе 1, Гаузе 2 і вівсяний агар з морською сіллю (2%) при температурі 30 °С протягом 10 днів [2].

В експерименті використано тест-штами індикаторних мікроорганізмів, представлених грампозитивними, грамнегативними бактеріями і дріжджоподібним грибом *Candida albicans* ATCC 18804. Штами грампозитивних бактерій – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kocuria rhizophila* DSM 348; грамнегативних бактерій – *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas putida* KT 2440. Штами індикаторних мікроорганізмів попередньо культивували протягом 24 год у поживному бульйоні (GranuCult® Nutrient Broth, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) при 37 °С (бактерії) і у рідкому середовищі Сабуро (NutriSelect® Plus Sabouraud-2% Dextrose Broth, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) при 30 °С (*C. albicans*).

Визначення антагоністичної активності проводили на середовищі LB (LB broth (MILLER) for Microbiology (Merck), Darmstadt, Germany) із 0,7% вмістом агар-агару методом блоків. Для цього агарові блоки 10-ти добових культур стрептоміцетів розкладали на попередньо засіяну добовою культурою тест-штаму (10^9 клітин/мл) поверхню середовища у чашках Петрі. На кожну засіяну чашку поміщали по 6 блоків випробуваних стрептоміцетів на однаковій відстані один від одного і від краю чашки. Облік результатів здійснювали після інкубації при оптимальних для кожної групи мікроорганізмів температурах через 24 год (для бактерій) і 48 год (для *C. albicans*), вимірюючи розміри зон відсутності росту індикаторних штамів навколо блоків зі стрептоміцетами [3].

Опрацювання отриманих результатів здійснювали за допомогою програми Microsoft Office Exel-2016. Визначали такі статистичні показники, як середнє арифметичне значення (M), стандартну похибку (m). Достовірність відмінностей між середніми значеннями встановлювали за t-критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95% ($p \leq 0,05$).

Результати та їх обговорення

Дослідження антагоністичних властивостей актинобактерій роду *Streptomyces*, виділених із біологічних обростань черепашнику і мідій, показало, що хоча б до одного індикаторного мікроорганізму активність проявили всі вивчені штами, що є свідченням антибіотичного потенціалу морських стрептоміцетів. З іншого боку, аналізуючи отримані результати, зауважимо варіабельність цієї ознаки і її залежність від багатьох чинників. Зокрема, на прояв антагоністичної активності стрептоміцетів (що полягало як в кількості чутливих індикаторів так і в розмірах зон пригнічення їх росту) впливало середовище попереднього культивування, джерело виділення, властивості конкретного штаму як продуцента, так і індикатора.

У таблицях 1 і 2 наведено результати визначення антагоністичної активності для штамів стрептоміцетів, виділених із біологічних обростань

черепашнику, після попереднього культивування на середовищі Гаузе 1, і стрептоміцетів, виділених із обростань мушлей мідій, після попереднього культивування на середовищі Гаузе 2, оскільки саме після вирощування на цих середовищах продуценти із вказаних джерел виділення проявили найбільшу активність щодо усіх індикаторів. Зони відсутності росту чутливих індикаторних мікроорганізмів за дії стрептоміцетів із черепашнику і мідій після попереднього культивування на вказаних середовищах коливалися від 12,4±0,3 мм до 20,6±0,2 мм і від 12,4±0,2 мм до 39,7±0,2 мм, відповідно.

Після попереднього культивування на середовищі Гаузе 1 усі виділені із черепашнику штами *Streptomyces* проявили пригнічувальну дію хоча б до одного індикатора. Виявлено 4 штами (що склало 21,1% від усіх виділених із черепашнику), що перешкоджали росту лише однієї тест-культури, 31,6% штамів запобігали росту 2-х тест-мікроорганізмів (табл. 1, рис. 1). У цей же час штам *Streptomyces* sp. Lim 2.2 згубно діяв на ріст 8 індикаторних мікроорганізмів.

Середовище Гаузе 1 є мінеральним, відносно бідним на джерела живлення. Можливо, саме цей фактор спонукав виділені із черепашнику стрептоміцети до синтезу протимікробних речовин відносно використаних індикаторів. Тобто в умовах дефіциту поживних речовин продукція різноманітних вторинних метаболітів може розглядатися як захисна адаптивна реакція.

У цей же час штами, виділені із мідій, кращу активність проявили після попереднього культивування на органічному середовищі Гаузе 2. При цьому лише один штам стрептоміцетів (*Streptomyces* sp. Myt 8b) пригнічував ріст одного індикатора (*P. putida* КТ 2440) (табл. 2, рис. 2). Інші виділені із мідій штами запобігали росту більшої кількості тест-культур. Два штами (14,3% від усіх виділених із мідій) – *Streptomyces* spp. Myt 4b і Myt 7ch – були антагоністами 10 індикаторів.

Для накопичення вторинних метаболітів мікроорганізмами велике значення має якісна характеристика окремих компонентів живильних середовищ для попереднього культивування [1, 23, 29]. Значно впливають на утворення антибіотичних речовин мікроорганізмами джерела нітрогену [16, 19]. Зазвичай у середовищах для культивування мікроорганізмів джерелами нітрогену є солі нітратної або рідше солі нітритної кислоти, амонійні солі органічних або неорганічних кислот, або амінокислоти, білки та продукти їх гідролізу. Як джерело карбону використовуються дицукриди, поліцукриди, спирти та органічні кислоти. На одних джерелах карбону ріст продуцентів та біосинтез антибіотичних речовин відбувається добре, на інших – мікроорганізми або не розвиваються, або не синтезують антибіотики [15, 25, 27]. При біосинтезі більшості продуктів обміну речовин мікроорганізмів до складу середовищ входять неорганічні фосфоровмісні сполуки у вигляді йонів фосфату. Вони необхідні для росту мікроорганізмів та синтезу багатьох життєво важливих сполук [20].

Отже, на наш погляд, отримання антагоністично активних штамів досить часто залежить і визначається джерелом ізоляції, оскільки в природних умовах конкуренції за джерела живлення перевагу мають мікроорганізми з кращою антибіотичною здатністю. А на прояв антагоністичних властивостей

Таблиця 1

Зони відсутності росту індикаторних мікроорганізмів (мм) за впливу стрептоміцетів із черепашнику після попереднього культивування на середовищі Гаузе 1

Table 1

Zones of growth inhibition of indicator microorganisms (mm) under the influence of streptomycetes from shell rock after pre-cultivation on Gauze 1 medium

Штам *Streptomyces spp.*	*S. aureus* АТСС 25923	*M. luteus* АТСС 4698	*E. faecalis* АТСС 29212	*K. rhizophila* DSM 348	*B. subtilis* АТСС 6633	*E. coli* АТСС 25922	*P. vulgaris* АТСС 6896	*S. enterica* NCTC 6017	*K. pneumoniae* АТСС 131	*P. aeruginosa* АТСС 27853	*P. putida* КТ 2440	*C. albicans* АТСС 18804
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Lim 2.1	14,3±0,2	16,4±0,2	14,9±0,1	16,8±0,2	14,3±0,2	0	0	0	0	0	0	0
Lim 2.2	16,5± 0,2	20,3±0,4	17,5±0,2	20,6±0,2	16,1±0,2	0	0	0	14,5±0,2	14,9±0,2	14,2±0,2	0
Lim 3.1	0	18,2±0,3	0	13,6±0,3	0	0	0	0	0	15,4±0,2	13,3±0,2	0
Lim 3.2	0	0	15,7±0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lim 3.3	13,2±0,1	0	0	13,7±0,2	0	0	14,2±0,2	0	14,8±0,2	14,3±0,3	14,3±0,1	0
Lim 3.4	0	18,2±0,3	0	0	0	0	0	0	0	15,6±0,2	0	0
Lim 4	0	0	16,5±0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	18,4±0,3
Lim 5.1	0	0	15,2±0,3	16,3±0,2	0	0	0	0	0	0	0	0

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Lim 5.2	0	0	0	14,4±0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
Lim 6.1	0	13,8±0,2	0	0	0	0	0	0	0	13,2±0,1	0	0
Lim 6.2	14,5±0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14,5±0,2	0
Lim 7.1	0	0	0	15,6±0,1	0	0	0	0	0	13,4±0,2	13,7±0,2	0
Lim 7.2	14,3±0,2	0	0	0	0	14,3±0,2	0	0	14,6±0,3	14,4±0,2	16,4±0,2	0
Lim 9.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14,3±0,1	0	0
Lim 9.2	0	0	0	16,5±0,2	0	0	0	0	0	0	15,4±0,2	0
Lim 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13,3±0,2	0	0
Lim 12.1	0	15,8±0,1	15,3±0,2	13,3±0,2	0	0	0	0	0	0	0	0
Lim 12.2	15,4±0,2	0	16,5±0,2	14,6±0,2	0	0	0	0	14,5±0,2	14,5±0,2	14,6±0,1	0
Lim 12.3	0	15,1±0,2	15,7±0,3	15,2±0,3	0	0	0	0	0	0	0	0
Lim Sb.	14,3±0,2	0	0	0	0	0	0	0	14,4±0,1	12,4±0,3	14,8±0,2	0

Таблиця 2

Зони відсутності росту індикаторних мікроорганізмів (мм) за впливу стрептоміцетів із мідій після попереднього культивування на середовищі Гаузе 2

Table 2

Zones of growth inhibition of indicator microorganisms (mm) under the influence of streptomycetes from mussels after pre-cultivation on Gauze 2 medium

Штам *Streptomyces spp.*	*S. aureus* АТСС 25923	*M. luteus* АТСС 4698	*E. faecalis* АТСС 29212	*K. rhizophila* DSM 348	*B. subtilis* АТСС 6633	*E. coli* АТСС 25922	*P. vulgaris* АТСС 6896	*S. enterica* NCTC 6017	*K. pneumoniae* АТСС 131	*P. aeruginosa* АТСС 27853	*P. putida* КТ 2440	*C. albicans* АТСС 18804
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Myt 1	13,6±0,2	0	0	0	0	14,2±0,1	0	15,6±0,2	14,7±0,2	15,6±0,3	0	0
Myt 2	15,5±0,3	26,6±0,2	0	29,7±0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
Myt 3a	18,7±0,1	21,2±0,1	0	29,4±0,3	0	0	0	0	0	0	0	0
Myt 3b	0	20,1±0,1	0	23,5±0,2	0	0	13,4±0,4	0	0	0	12,5±0,2	0
Myt 4b	12,5±0,1	15,5±0,2	0	14,6±0,2	0	13,6±0,2	13,0±0,2	14,2±0,1	14,3±0,1	14,7±0,2	14,3±0,1	14,4±0,1
Myt 5	16,3±0,1	29,7±0,5	0	19,4±0,3	13,5±0,2	23,4±0,2	0	0	21,0±0,3	0	17,4±0,2	16,5±0,2
Myt 6	0	0	0	0	0	15,5±0,3	0	13,5±0,2	13,6±0,3	0	0	0
Myt 7b	18,6±0,3	32,6±0,2	0	26,7±0,2	14,1±0,1	22,4±0,3	0	0	23,6±0,2	0	18,5±0,3	15,4±0,1

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Myt 7ch	18,5±0,2	29,7±0,2	0	22,8±0,1	14,9±0,1	21,2±0,3	13,7±0,2	13,0±0,1	24,3±0,2	0	22,2±0,2	14,9±0,2
Myt 8b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,5±0,2	0
Myt 10	12,8±0,2	14,7±0,2	0	13,2±0,2	0	13,2±0,2	13,6±0,3	0	13,6±0,4	13,2±0,3	13,7±0,2	0
Myt 11	12,4±0,2	14,4±0,1	16,7±0,3	14,2±0,1	0	14,2±0,2	0	13,6±0,3	14,8±0,2	0	0	0
Myt 12a	29,4±0,1	39,7±0,2	17,4±0,4	30,7±0,4	28,4±0,2	0	0	0	21,5±0,4	0	0	0
Myt 12b	28,3±0,3	36,7±0,2	19,3±0,3	33,7±0,3	27,0±0,3	0	13,5±0,2	0	24,6±0,4	13,5±0,2	0	0

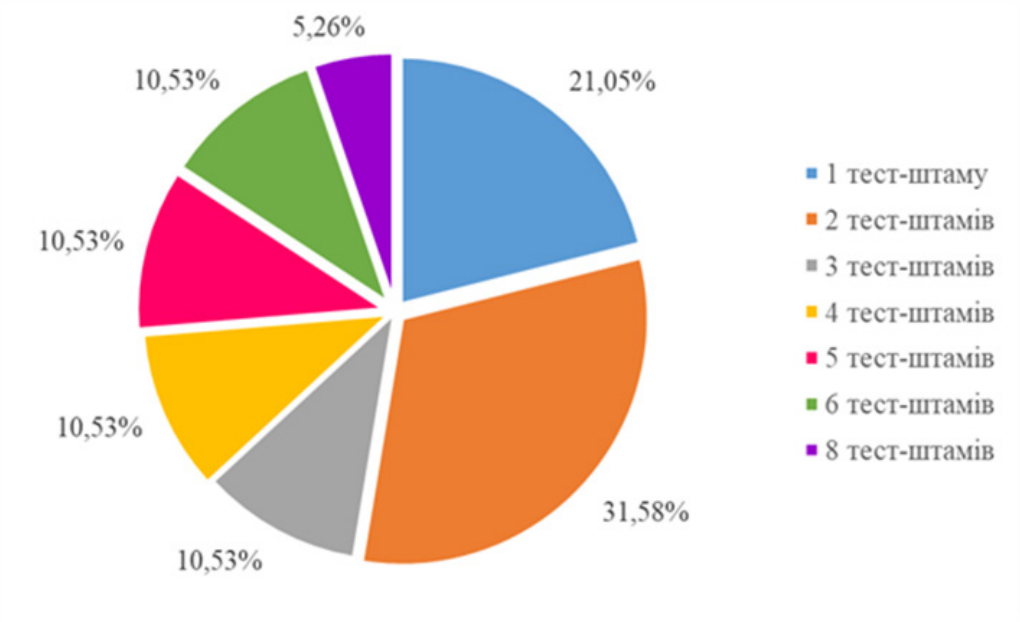


Рис. 1. Частка антагоністично активних штамів стрептоміцетів, виділених із черепашнику, після попереднього культивування на середовищі Гаузе 1

Fig. 1. Proportion of antagonistically active strains of streptomycetes isolated from shell rock after pre-cultivation on Gauze 1 medium

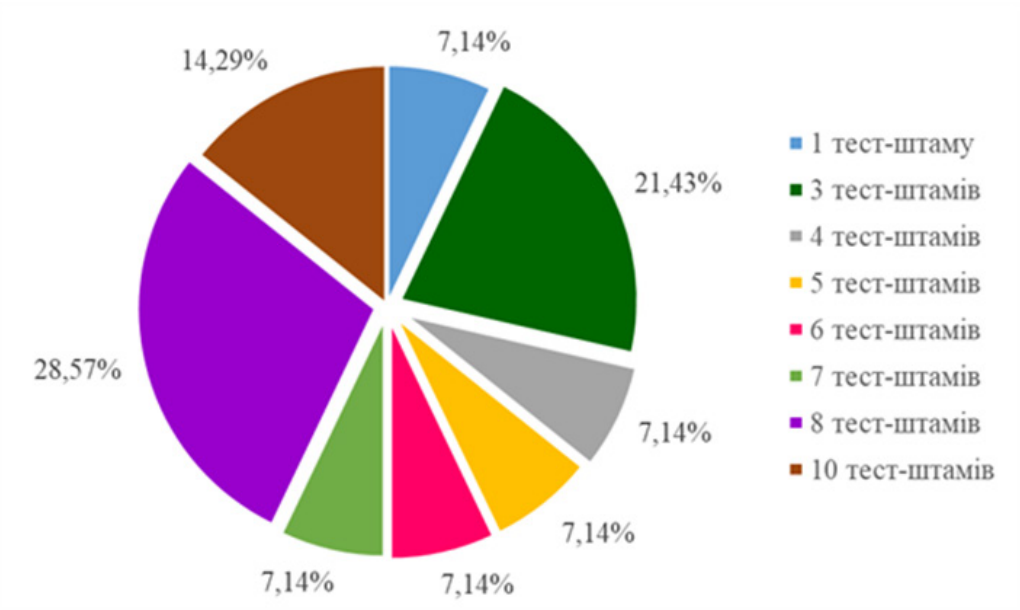


Рис. 2. Частка антагоністично активних штамів стрептоміцетів, виділених із мідій, після попереднього культивування на середовищі Гаузе 2

Fig. 2. Proportion of antagonistically active strains of streptomycetes isolated from mussels after pre-cultivation on Gauze 2 medium

суттєво впливає компонентний склад середовищ для попереднього культивування. За літературними даними антагоністична активність також залежить також від інших чинників, зокрема pH, температури і часу попередньої інкубації продуцентів та ін. [4, 26].

Важливе значення для реалізації антагоністичного потенціалу продуцентів (тобто комплексу їх антибіотичних речовин) має чутливість конкретного штаму індикатору.

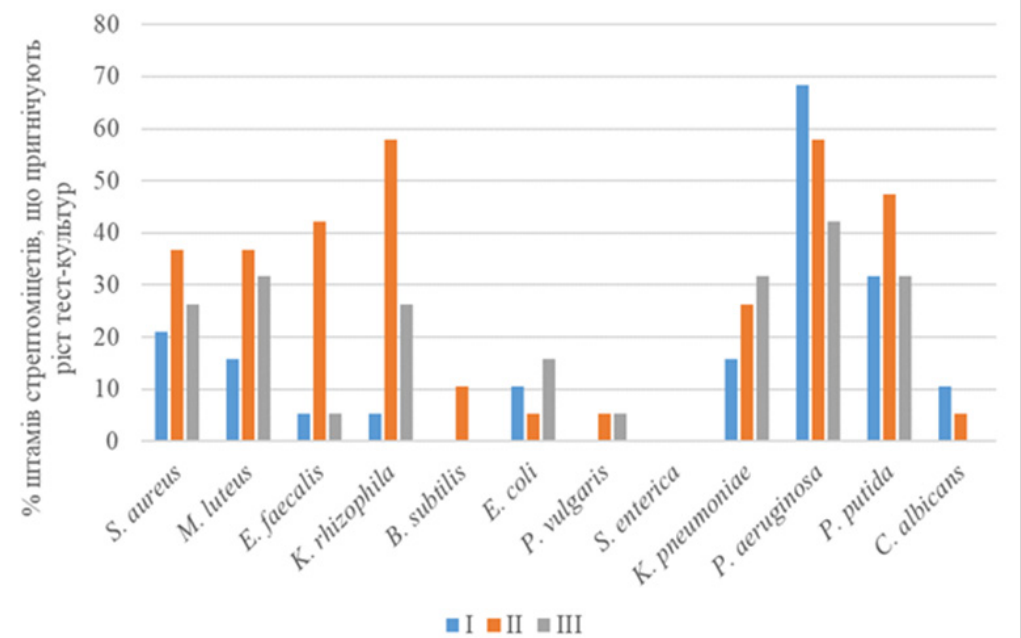
Отримані дані щодо антагоністичної активності виділених із черепашнику стрептоміцетів демонструють, що грампозитивні бактерії, представлені штамами *M. luteus* ATCC 4698, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *K. rhizophila* DSM 348 (за виключенням *B. subtilis* ATCC 6633) набагато чутливіші, у порівнянні із бактеріями родини *Enterobacteriaceae* (рис. 3). Серед бактерій кишкової групи лише *K. pneumoniae* ATCC 10031 пригнічувалася метаболітами приблизно 30,0% штамів стрептоміцетів за їх попереднього культивування на середовищах Гаузе 1 і вівсяний агар з морською сіллю. Більше половини виділених із черепашнику штамів стрептоміцетів (за попереднього культивування на середовищах Гаузе 2 і Гаузе 1) пригнічували ріст *P. aeruginosa* ATCC 27853. Два штами, *Streptomyces* sp. Lim 4 і *Streptomyces* sp. Lim 3.2, проявили антагоністичну активність щодо *C. albicans* ATCC 18804, причому *Streptomyces* sp. Lim 4 за попереднього культивування і на середовищі Гаузе 2, і на середовищі Гаузе 1 (табл. 1, рис. 3).

Індикаторні мікроорганізми були більш чутливими до антагоністично активних штамів стрептоміцетів, виділених із мідій. Так само як і до стрептоміцетів із черепашнику чутливішими були грампозитивні бактерії (рис. 4). Але при цьому і розміри зон відсутності росту індикаторів, і кількість штамів стрептоміцетів-антагоністів були більшими (табл. 2, рис. 4). Чутливими до різної кількості стрептоміцетів також були представники родин *Enterobacteriaceae* і *Pseudomonadaceae*, а також дріжджоподібний мікроорганізм *C. albicans* ATCC 18804. Зауважимо, що кращу активність у більшості випадків стрептоміцети із мідій демонстрували після попереднього культивування на середовищі Гаузе 2.

Заслуговує уваги, що більшість штамів стрептоміцетів із мідій (78,6%) проявили антагонізм щодо індикаторного штаму *S. aureus* ATCC 25923 (рис. 4). Зокрема мова йде про штами *Streptomyces* spp. Myt 7b, Myt 7ch, Myt 5, Myt 2, Myt 3a, 12a, 4b, Myt 11, Myt 1, Myt 10, Myt 12b.

Найбільше ріст стафілококу пригнічували штами *Streptomyces* spp. Myt 12a і Myt 12b після попереднього культивування на середовищі Гаузе 2 (розміри зон відсутності росту були 29,4±0,1 мм і 28,3±0,3 мм, відповідно) (табл. 2). Отримані результати є обнадійливими, оскільки останнім часом з'являється все більше інформації про розповсюдження мультирезистентних штамів золотистого стафілококу, які або самі є причиною виникнення більше 100 форм інфекцій, у тому числі нозокоміальних, або викликають ускладнення основного захворювання [21].

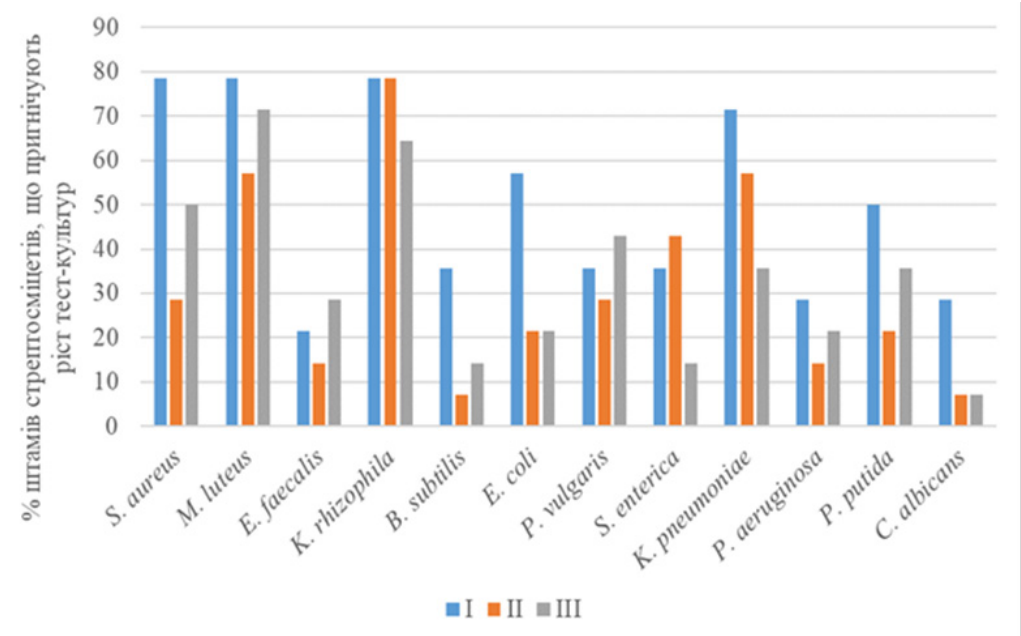
Заслуговують на увагу штами *Streptomyces* spp. Myt 8 b, Myt 7b, Myt 7ch, Myt 5, Myt 4b, які так само як і штами *Streptomyces* spp. Lim 4 і Lim 3.2 пригнічують ріст *C. albicans*, що відзначається стійкістю до антибіотичних препаратів.



I – Гаузе 2, II – Гаузе 1, III – вівсяний агар з 2% морської солі

Рис. 3. Антагоністична активність штамів стрептоміцетів, виділених із черепашнику

Fig. 3. Antagonistic activity of streptomycetes' strains isolated from shell rock



I – Гаузе 2, II – Гаузе 1, III – вівсяний агар з 2% морської солі

Рис. 4. Антагоністична активність штамів стрептоміцетів, виділених із мідій

Fig. 4. Antagonistic activity of streptomycetes' strains isolated from mussels

Таким чином, оцінюючи антагоністичний потенціал стрептоміцетів, виділених із різних джерел Одеської затоки Чорного моря, для подальших досліджень (зокрема, для проведення екстракції і вивчення хімічної структури антимікробних метаболітів) можемо рекомендувати штами *Streptomyces* spp. Lim 2.2, Lim 4, Lim 5.1 і Lim 7.2, виділені із обростань черепашнику, і штами *Streptomyces* spp. Myt 7b, Myt 7ch, Myt 12a і Myt 12b, виділені із мідій, які пригнічують ріст більшості індикаторних мікроорганізмів.

I.V. Strashnova, K.S. Potapenko, N.V. Korotaeva, G.V. Lisyutin, I.P. Metelitsyna

Odesa I.I. Mechnikov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: fabiyanska@ukr.net

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF THE BLACK SEA STREPTOMYCETES ISOLATED FROM THE FOULING OF SHELL ROCK AND MUSSELS

Summary

The rapid emergence of resistance by bacterial and fungal pathogens is a serious problem in the health care system, which causes the search for new promising producers of antimicrobial natural products in various ecological niches. ***Aim.*** *To determine the antagonistic activity of streptomycetes isolated from the biological fouling of natural shell rock and mussels of the Odesa gulf of the Black Sea.* ***Methods.*** *The antagonistic activity of 19 and 14 strains of streptomycetes isolated from the fouling of shell rock and mussels of the Odesa gulf, respectively, were investigated. Streptomycetes were pre-cultivated on agar media Gause 1, Gause 2 and oat agar with sea salt (2%) at a temperature of 30 °C for 10 days. Antagonistic activity against 12 test cultures was determined by the block method.* ***Results.*** *All isolated marine streptomycetes are antagonists of at least one strain of the indicator microorganism. Antibiotic activity depended on the source of the streptomycetes isolation, culture medium and properties of specific strains of both producers and test cultures. The best activity of streptomycetes strains from shell rock was shown after cultivation on Gause 1 medium, and streptomycetes from mussels – after cultivation on Gause 2 medium. The zones of no growth of sensitive indicators ranged from 12,4±0,3 mm to 20,6±0,2 mm (under the influence of streptomycetes from shell rock) and from 12,4±0,2 mm to 39,7±0,2 mm (under the influence of streptomycetes from mussels). Streptomyces sp. Lim 2.2 (strain from a shell rock) inhibited the growth of 8 test cultures, and strains from mussels Streptomyces sp. Myt 4b and Myt 7ch – 10 test cultures. Indicator strains of gram-positive bacteria were the most sensitive to all streptomycetes, in particular, strain Staphylococcus aureus ATCC 25923 was most inhibited by metabolites of Streptomyces spp. Myt 12a and Myt 12b.* ***Conclusions.*** *Antagonistic activity of streptomycetes isolated from the Black Sea depended on the source of isolation, pre-cultivation medium and properties of both producer strains and indicator microorganisms. The greatest activity of streptomycete strains from shell rock and mussels was shown after preliminary cultivation, respectively, on Gause 1 and Gause 2 media against gram-positive bacteria. The best antibiotic potential was found in strains of Streptomyces sp. Lim 2.2, Lim 4, Lim 5.1 and Lim 7.2, isolated*

from the fouling of shell rock, and strains of Streptomyces sp. Myt 7b, Myt 7ch, Myt 12a and Myt 12b isolated from mussels.

Key words: marine streptomycetes, antagonistic activity, indicator microorganisms

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Белявская Л.А., Ефименко Т.А., Ефременкова О.В., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А.* Идентификация и антагонистические свойства почвенного стрептомицета *Streptomyces* sp. 100 // Микробиол. журн. – 2016. – Т. 78, № 2. – С. 61–73.
2. *Білявська Л.О.* Актинобактерії роду *Streptomyces* і їхні метаболіти у біорегуляції рослин: дис. ... док. біол. наук : 03.00.07. Київ. – 2018. – 485 с.
3. *Громико О.* Антагоністичні властивості актиноміцетів прикореневої зони маслини європейської *Olea europaea* L. // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2012. – Вип. 59. – С. 209–215.
4. *Дрегваль О.А., Єременко А.О., Черевач Н.В., Вінніков А.І.* Антагоністична активність ґрунтових стрептоміцетів по відношенню до фітопатогенних бактерій та грибів // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – № 1. – С. 73–84. doi: https://doi.org/10.18524/2307-4663.2017.1(37).96323
5. *Коротаєва Н.В., Потапенко К.С., Страшнова І.В., Метеліцина І.П., Іваниця В.О.* Спектри жирних кислот актинобактерій біологічних обростань Одеської затоки Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2021. – № 3 (53). – С. 60–70.
doi: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).245369
6. *Коротаєва Н.В., Страшнова І.В., Васильєва Н.Ю., Потапенко К.С., Метеліцина І.П., Філіпова Т.О., Іваниця В.О.* Характеристика актинобактерій, ізольованих із *Mytilus galloprovincialis* Одеської затоки Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2021. – № 3 (53). – С. 84–98.
doi: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).246392
7. *Кравченко В.Г.* Сучасні топічні антибактеріальні засоби в умовах антибіотикорезистентності мікробної флори // Українські медичні вісті. – 2021. – Т.13, № 2 (87). – С. 143–147. doi: 10.32471/umv.2709-6432.87.1406
8. *Потапенко К.С., Коротаєва Н.В., Іваниця В.О.* Вторинні метаболіти морських актинобактерій з антибіотичною активністю // Мікробіологія і біотехнологія. – 2021. – № 3 (53). – С. 28–43.
doi: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).245323
9. *Страшнова І.В., Коротаєва Н.В., Потапенко К.С., Васильєва Н.Ю., Чабан М.М., Штеніков М.Д., Лісютін Г.В., Іваниця В.О.* Актинобактерії обростання твердих субстратів Одеської затоки Чорного моря // Морський екологічний журнал. – 2021. – № 2. – С. 71–82.
doi: https://doi.org/10.47143/1684-1557/2021.2.07
10. *Aljelawi R.O., Kadhem M.F.* Production, purification, and characterization of bioactive metabolites produced from rare actinobacteria *Pseudonocardia Alni* // Asian J. Pharm. Clin. Res. – 2016. – V. 9 (3). – P. 1–3.
11. *Baltz R.H.* Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? // J. Ind. Microbiol.

and Biotechnol. – 2006. – V. 33 (7). – P. 507–513. https://doi.org/10.1007/s10295-005-0077-9

12. *Chevrette M.G., Carlson C.M., Ortega H.E., Thomas C., Ananiev G.E. et al.* The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes // Nature communications. – 2019. – V. 10. – P. 1–11. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08438-0
13. *De La Hoz-Romo M.C., Díaz L., Villamil L.* Marine actinobacteria a new source of antibacterial metabolites to treat acne vulgaris disease – A systematic literature review // Antibiotics. – 2022. – V. 11. – P. 1–37. https://doi.org/10.3390/antibiotics11070965
14. *Dholakiya R.N., Kumar R., Mishra A., Mody K.H., Jha B.* Antibacterial and antioxidant activities of novel *Actinobacteria* strain isolated from gulf of Khambhat, Gujarat // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – P. 1–16. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02420
15. *Dundore-Arias J.P., Felice L., Dill-Macky R., Kinkel L.L.* Carbon amendments induce shifts in nutrient use, inhibitory, and resistance phenotypes among soilborne *Streptomyces* // Frontiers in Microbiology. – 2019. – V. 10. – P. 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00498
16. *Gao H., Liu M., Liu J., Dai H., Zhou X. et al.* Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology // Bioresource Technol. – 2019. – V. 100 (17). – P. 4012–4016. doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.013
17. *Gavriilidou A., Mackenzie T., Sánchez P., Tormo J., Ingham C. et al.* Bioactivity screening and gene-trait matching across marine sponge-associated bacteria // Mar. Drugs. – 2021. – V. 19 (2). – P. 1–17. https://doi.org/10.3390/md19020075
18. *Lewin G.R., Carlos C., Chevrette M.G., Horn H., McDonald B.R. et al.* Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications // Annu. Rev. Microbiol. – 2016. – V. 70. – P. 235–254. doi:10.1146/annurev-micro-102215-095748
19. *Marques D.A.V., Cunha M.N.C., Araujo J.M., Filho J.L., Converti A. et al.* Optimization on clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 by response surface methodology // Braz. J. Microbiol. – 2011. – V. 42 (2). – P. 658–667. doi: 10.1590/S1517-838220110002000030
20. *Martin J.F.* Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story // J. Bacteriol. – 2004. – V. 186 (16). – P. 5197–5201. doi: 10.1128/JB.186.16.5197-5201.2004
21. *Mukherjee R., Priyadarshini A., Pandey R.P., Raj V.S.* Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* / Insights into drug resistance in *Staphylococcus aureus*. – IntechOpen, 2021. – P. 1–14. doi: 10.5772/intechopen.96888
22. *Newman D.J., Cragg G.M.* Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019 // J. Nat. Prod. – 2020. – V. 83. – P. 770–803. https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285?ref=pdf
23. *Razieh R.* Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in *Streptomycetes* // Asian J. of Pharm. and Heal. Sci. – 2013. – V.3 (3). – P. 810–815. www.ajphs.com.

24. *Sabido E.M., Tenebro C.P., Suarez A.F.L., Ong S.D.C., Trono D.J.V.L. et al.* Marine sediment-derived *Streptomyces* strain produces angucycline antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* Harboring SCCmec Type 1 Gene // J. Mar. Sci. Eng. – 2020. – V. 8 (10). – P. 1–19. https://doi.org/10.3390/jmse8100734
25. *Sanchez S., Chavez A., Forero A., Garcia-Hunte Y., Romero A. et al.* Carbon source regulation of antibiotic production // J. Antibiot. – 2010. – V. 63 (8). – P. 442–459. doi: 10.1038/ja.2010.78
26. *Singh L.S., Sharma H., Talukdar N.C.* Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India // BMC Microbiology. – 2014. – V. 14. – P. 1–13. http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/278.
27. *Zhu C.H., Lu F.P., He Y.N., Han Z.L., Du L.X.* Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*: effect of glucose, ammonium ion and inorganic phosphate // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V.73 (5). – P. 1031–1038. doi:10.1007/s00253-006-0572-6
28. *Tan L., Li L., Ashbolt N., Wang X., Cui Y. et al.* Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin // Sci. Total Environ. – 2018. – V. 621. – P. 1176–1184. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.110
29. *Tata S., Yekkour A., Mokrane S., Chaabane Chaouch F., Bouras N. et al.* Influence of culture media on antifungal activity produced by produced by *Streptomyces* sp. Pal 114 isolated from Ghardaïa date palm grove soils // Af. Rev. of Sci. – 2018. – V. 3 (2). – P. 22–29.
30. *World Health Organization (WHO).* Lack of New Antibiotics Threatens Global Efforts to Contain Drug-Resistant Infections. Available online: https://www.who.int/news-room/detail/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections (accessed on 29 April 2020).
31. *World Health Organization (WHO).* La Escasez Mundial de Antibióticos Innovadores Favorece La Aparición y Propagación de La Farmacorresistencia. Available online: https://www.who.int/es/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance (accessed on 28 January 2022).

REFERENCES

1. Biliavska LA, Efimenko TA, Efremenkova OV, Koziritska VYe, Iutynska GA. Identification and antagonistic properties of the soil streptomycete *Streptomyces* sp. 100. *Microbiol. zhurn*. 2016; 78(2): 61–73 (in Russian).
2. Bilyavs'ka L.O. Aktynobakteriyi rodu *Streptomyces* i yikhni metabolity u bioregulyaciyi roslyn: dis. ... doc. biol. nauk. Kyiv. 2018: 485 (in Ukrainian).
3. Gromyko O. Antagonistic properties of actinomycete from the ryzospere of *Olea europaea* L. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*. 2012; 59: 209–215 (in Ukrainian).
4. Drehval OA, Yeremenko AO, Cherevach NV, Vinnikov AI. Antagoistic activity of soil streptomycetes against phytopathogenic bacteria and fungi.

Mi*c*robiology and biotechnology. 2017; 1: 73–84 (in Ukrainian). doi: https://doi.org/10.18524/2307-4663.2017.1(37).96323
5. Korotaeva NV, Potapenko KS, Strashnova IV, Metelitsyna IP, Ivanytsia VO. The composition of cellular fatty acids of actinobacteria from the surfaces of biological growth of the Odesa gulf of the Black Sea. Mi*c*robiology and biotechnology. 2021; 3(53): 60–70 (in Ukrainian). doi: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).245369
6. Korotaeva NV, Strashnova IV, Vasylieva NYu, Potapenko KS, Metelitsyna IP, Filipova TO, Ivanytsia VO. Characteristics of actinobacteria from Mytilus galloprovincialis of Odesa gulf of the Black Sea. Mi*c*robiology and biotechnology. 2021; 3(53): 84–98 (in Ukrainian). doi: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).246392
7. Kravchenko VH. Modern topic antibacterial agents in the conditions of antibiotic resistance of human microbial flora. *Ukrainski medychni visti*. 2021; 13; 2(87): 143–147 (in Ukrainian). doi: 10.32471/umv.2709-6432.87.1406
8. Potapenko KS, Korotaeva NV, Ivanytsia VO. Secondary metabolites of marine actinobacteria with antibiotic activity. Mi*c*robiology and biotechnology. 2021; 3(53): 28–43 (in Ukrainian). doi: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).245323
9. Strashnova IV, Korotaeva NV, Potapenko KS, Vasylieva NYu, Chaban MM, Shtenikov MD, Lisyutin GV, Ivanytsia VO. Actinobacteria of growth of solid substrates of the Odesa gulf of the Black Sea. Marine ecological journal. 2021; 2: 71–82 (in Ukrainian). doi: https://doi.org/10.47143/1684-1557/2021.2.07
10. Aljelawi RO, Kadhem MF. Production, purification, and characterization of bioactive metabolites produced from rare actinobacteria *Pseudonocardia Alni*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2016; 9(3): 1–3.
11. Baltz RH. Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *J. Ind. Microbiol. and Biotechnol*. 2006; 33(7): 507–513. https://doi.org/10.1007/s10295-005-0077-9
12. Chevrette MG, Carlson CM, Ortega HE, Thomas C, Ananiev GE et al. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nature communications*. 2019; 10: 1–11. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08438-0
13. De La Hoz-Romo MC, Díaz L, Villamil L. Marine actinobacteria a new source of antibacterial metabolites to treat acne vulgaris disease – A systematic literature review. *Antibiotics*. 2022; 11: 1–37. https://doi.org/10.3390/antibiotics11070965
14. Dholakiya RN, Kumar R, Mishra A, Mody KH, Jha B. Antibacterial and antioxidant activities of novel *Actinobacteria* strain isolated from gulf of Khambhat, Gujarat. *Front. Microbiol*. 2017; 8: 1–16. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02420
15. Dundore-Arias JP, Felice L, Dill-Macky R, Kinkel LL. Carbon amendments induce shifts in nutrient use, inhibitory, and resistance phenotypes among soilborne *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10: 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00498

16. Gao H, Liu M, Liu J, Dai H, Zhou X et al. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresource Technol*. 2019; 100(17): 4012–4016. doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.013
17. Gavriilidou A, Mackenzie T, Sánchez P, Tormo J, Ingham C et al. Bioactivity screening and gene-trait matching across marine sponge-associated bacteria. *Mar. Drugs*. 2021; 19(2): 1–17. https://doi.org/10.3390/md19020075
18. Lewin GR, Carlos C, Chevrette MG, Horn H, McDonald BR et al. Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications. *Annu. Rev. Microbiol*. 2016; 70: 235–254. doi:10.1146/annurev-micro-102215-095748
19. Marques DAV, Cunha MNC, Araujo JM, Filho JL, Converti A et al. Optimization on clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 by response surface methodology. *Braz. J. Microbiol*. 2011; 42(2): 658–667. doi: 10.1590/S1517-838220110002000030
20. Martin JF. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J. Bacteriol*. 2004; 186(16): 5197–5201. doi: 10.1128/JB.186.16.5197-5201.2004
21. Mukherjee R, Priyadarshini A, Pandey RP, Raj VS. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Insights into drug resistance in Staphylococcus aureus*. IntechOpen, 2021: 1–14. doi: 10.5772/intechopen.96888
22. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod*. 2020; 83: 770–803. https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285?ref=pdf
23. Razieh R. Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in *Streptomycetes*. *Asian J. of Pharm. and Heal. Sci*. 2013; 3(3): 810–815. www.ajphs.com.
24. Sabido EM, Tenebro CP, Suarez AFL, Ong SDC, Trono DJVL et al. Marine sediment-derived *Streptomyces* strain produces angucycline antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* Harboring SCCmec Type 1 Gene. *J. Mar. Sci. Eng*. 2020; 8(10): 1–19. https://doi.org/10.3390/jmse8100734
25. Sanchez S, Chavez A, Forero A, Garcia-Hunte Y, Romero A et al. Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiot*. 2010; 63(8): 442–459. doi: 10.1038/ja.2010.78
26. Singh LS, Sharma H, Talukdar NC. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. *BMC Microbiology*. 2014; 14: 1–13. http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/278.
27. Zhu CH, Lu FP, He YN, Han ZL, Du LX. Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*: effect of glucose, ammonium ion and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2007; 73(5): 1031–1038. doi:10.1007/s00253-006-0572-6
28. Tan L, Li L, Ashbolt N, Wang X, Cui Y et al. Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. *Sci. Total Environ*. 2018; 621: 1176–1184. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.110

29. Tata S, Yekkour A, Mokrane S, Chaabane Chaouch F, Bouras N et al. Influence of culture media on antifungal activity produced by produced by *Streptomyces* sp. Pal 114 isolated from Ghardaïa date palm grove soils. *Af. Rev. of Sci.* 2018; 3(2): 22–29.
30. World Health Organization (WHO). Lack of New Antibiotics Threatens Global Efforts to Contain Drug-Resistant Infections. Available online: https://www.who.int/news-room/detail/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections (accessed on 29 April 2020).
31. World Health Organization (WHO). La Escasez Mundial de Antibióticos Innovadores Favorece La Aparición y Propagación de La Farmacorresistencia. Available online: https://www.who.int/es/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance (accessed on 28 January 2022).

Стаття надійшла до редакції 02.12.2022 р.