

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

**Кваліфікаційна робота**  
на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

**«Оптимізація складу поживних середовищ для культивування морських актинобактерій»**

---

**«Optimizing the composition of nutrient medium for the cultivation of marine actinobacteria»**

**Виконала:** здобувачка денної форми навчання спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія Освітня програма Біотехнології та біоінженерія Бідник Марина Юріївна

**Керівник:** кандидат біологічних наук, доцент Зінченко Оксана Юріївна

**Рецензент:** кандидат біологічних наук, доцент кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики Чернадчук Сніжана Сергіївна

Рекомендовано до захисту:  
Протокол засідання кафедри  
№ від « » 2023 р.

Захищено на засіданні ЕК №  
Протокол № \_\_\_\_\_ від «\_\_» \_\_\_\_\_ р.  
Оцінка \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Завідувач кафедри

Голова ЕК

\_\_\_\_\_  
(підпис) **Тетяна ФІЛІПОВА**  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис) **Ганна ЯМБОРКО**  
(прізвище та ініціали)

**Одеса – 2023**

## АНОТАЦІЯ

Проведено оптимізацію складу поживних середовищ для культивування морських актинобактерій задля отримання більшої кількості антибіотиків з меншими економічними витратами. Визначено антимікробні властивості вторинних метаболітів, виділених досліджуваним штамом *Streptomyces ambofaciens* Myt7 щодо тест-штамів умовно-патогенних мікроорганізмів. Здійснено біоінформатичний пошук у базах даних для прогнозування можливого спектру антимікробних метаболітів досліджуваного мікроорганізму та розроблено підходи до оптимізації шляхів їх отримання.

Дипломну роботу викладено на 60 сторінках, міститься 6 рисунків та 13 таблиць. Наведено посилання на 56 джерел літератури ( 3 кирилицею та 53 латиницею).

**Ключові слова:** *Streptomyces ambofaciens* Myt7, оптимізація середовища, antiSMASH, вторинні метаболіти, антимікробні речовини.

The composition of nutrient media for the cultivation of marine actinobacteria was optimised to produce more antibiotics at lower economic costs. The antimicrobial properties of secondary metabolites isolated by the studied strain of *Streptomyces ambofaciens* Myt7 against test strains of opportunistic pathogens were determined. A bioinformatics search in databases was carried out to predict the possible spectrum of antimicrobial metabolites of the studied microorganism and approaches to optimise the ways of their production were developed.

The diploma work is presented on 60 pages, contains 6 figures and 13 tables. References to 56 sources of literature (3 in Cyrillic and 53 in Latin) are given.

**Key words:** *Streptomyces ambofaciens* Myt7, medium optimisation, antiSMASH, secondary metabolites, antimicrobial substances.

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	6
1.1. Загальна характеристика та класифікація актинобактерій .....	6
1.1.1. Екологія актинобактерій .....	6
1.1.2. Морфологія актинобактерій.....	9
1.2. Біологічні особливості морських актинобактерій .....	11
1.3. Практичне значення морських актинобактерій .....	14
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	20
2.1. Культивування штаму Myt7 та штамів індикаторів .....	20
2.2. Оптимізація складу живильних середовищ для культивування штаму Myt7 .....	21
2.3. Статистичний аналіз отриманих результатів .....	23
2.4. Дослідження антагоністичної активності штаму Myt7 методом лунок .	24
2.5. Пошук кластерів генів з використанням antiSMASH.....	26
2.6 Біотехнологічна схема отримання вторинних метаболітів <i>Streptomyces ambofaciens</i> Myt7 .....	27
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	30
3.1. Визначення здатності досліджуваного штаму до продукування антимікробних речовин на середовищах різного складу.....	30
3.2. Оптимізація живильного середовища для штаму Myt7 з метою підвищення його антагоністичної активності при використанні дисперсійного аналізу.....	36
3.3. Характеристика антимікробних речовин дослідженого штаму за результатами біоінформатичного пошуку.....	42
УЗАГАЛЬНЕННЯ .....	51
ВИСНОВКИ.....	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	54

## ВСТУП

Актинобактерії – це грампозитивні мікроорганізми, які здатні до міцеліального росту та утворення на повітряному міцелії гідрофобних спор. Є одними з найважливіших прокариотів для біотехнології, оскільки синтезують багато біологічно активних речовин – вторинних метаболітів, зокрема антибіотиків, які мають широке застосування в фармації. На сьогодні розвиток досліджень актинобактерій дуже актуальний, оскільки їх вторинні метаболіти є предметом багатьох наукових досліджень та потенційним джерелом відкриття нових фармацевтично значущих сполук [Ludwig et al., 2012].

Актинобактерії виявлені в багатьох екосистемах нашої планети. Відомо, що тільки актинобактерії роду *Streptomyces* виробляють приблизно 80% антибіотиків. Антибіотики були великим відкриттям для медицини, і їх застосування давало надію на повне та надійне лікування від інфекцій, викликаних мікроорганізмами [Clardy et al., 2009]. Здавалося, що жодна інфекційна хвороба не може встояти перед антибіотиками. Проте, згодом стало зрозуміло, що антибіотикотерапія має свої недоліки. Мікроорганізми почали набувати стійкості до антибіотиків, що було неминучим наслідком, а її поширення – лише питанням часу [Ventola, 2015]. Нині ми стикаємося з проблемою мультирезистентності у патогенів, яка створює серйозну небезпеку для людського здоров'я. Одним з найбільш обіцяючих шляхів вирішення цієї проблеми є розробка нових антимікробних засобів. Це сприяє зростанню інтересу до пошуку нових природних біологічно активних сполук [Newman, 2020].

Зараз більш ніж половина комерційних препаратів мають природне походження або створені на основі природних сполук. Актинобактерії класу *Actinomycetia* відомі своєю здатністю виробляти широкий спектр біологічно активних сполук. Близько двох третин усіх відомих антибіотиків виробляють актинобактерії, переважно стрептоміцети роду *Streptomyces* [Barka et al., 2015]. Однак виділення та впровадження нових сполук значно уповільнилося.

Причиною цього є часте повторне відкриття вже описаних сполук, особливо серед стрептоміцетів. [Sivalingam et al., 2019].

Метою дослідження була оптимізація складу поживних середовищ для культивування морських актинобактерій, а саме *Streptomyces ambofaciens* Mut7, який був виділений з поверхні мушлі мідій, ізольованих з Чорного моря з метою отримання більшої кількості антибіотиків з меншими витратами, що є важливим для промислового виробництва.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні *задачі*:

1. Провести оптимізацію складу поживних середовищ для культивування морських актинобактерій задля отримання більшої кількості антибіотиків з меншими економічними витратами.

2. Визначити антимікробні властивості вторинних метаболітів, виділених досліджуваним штамом *Streptomyces ambofaciens* Mut7 щодо тест-штамів умовно-патогенних мікроорганізмів.

3. Здійснити біоінформатичний пошук у базах даних для прогнозування можливого спектру антимікробних метаболітів досліджуваного мікроорганізму та розробки підходу до оптимізації шляхів їх отримання.

*Об'єкт дослідження* – отримання антимікробних сполук з морських актинобактерій.

*Предмет дослідження* – оптимізація складу поживних середовищ для підвищення синтезу антимікробних сполук актинобактеріями Чорного моря.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Загальна характеристика та класифікація актинобактерій

#### 1.1.1. Екологія актинобактерій

Актинобактерії відіграють важливу роль у біосфері Землі, займаючи різноманітні екологічні ніші та беручи участь у численних біологічних процесах. Ці мікроорганізми, переважно вільноживучі сапрофіти, поширені в різних середовищах, включаючи ґрунт, повітря, а також у водних середовищах, зокрема в солоних водах [Macagnan et al., 2006]. Більша частина актинобактерій, зокрема стрептоміцети, переважно знаходяться в ґрунті, де вони проводять більшу частину свого життєвого циклу у формі спор, які є механізмом пристосування до умов з обмеженим доступом до поживних речовин [Devanshi et al., 2022]. Актинобактерії можна знайти як на поверхні землі, так і на глибині більше двох метрів. Ці мікроорганізми віддають перевагу лужним та багатим на органіку ґрунтам, де вони є важливою складовою мікробного співтовариства [Goodfellow et al., 1983].

Абіотичні параметри ґрунту, такі як рН, текстура, наявність поживних речовин та вологість, визначають склад та функціональність мікробного біоценозу в ґрунті. Концентрація актинобактерій у ґрунті може досягати від  $10^6$  до  $10^9$  клітин на грам [Srinivasan et al., 1991]. Актинобактерії, як і більшість ґрунтових бактерій, переважно є мезотермофілами з оптимальним діапазоном температур для росту між  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  та  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Проте існують термофільні види, які можуть рости при температурах  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Edwards, 1993]. Низька вологість сприяє вегетативному росту актинобактерій, тоді як висока вологість може призупинити або повністю зупинити їх ріст. Більшість актинобактерій віддають перевагу нейтральним або слаболужним ґрунтам з рН 6 - 9, хоча деякі стрептоміцети були виділені з кислих ґрунтів з рН 3,5 [Kim et al., 2003].

Актинобактерії представляють собою гетерогенну групу грампозитивних бактерій, які вирізняються високим вмістом гуаніну (G) та

цитозину (С) у їх ДНК [Takahashi et al., 2018] (понад 55% [Doroghazi et al., 2013]), характеризуються повітряним і субстратним міцеліальним ростом, формуючи ниткоподібні сітки. Ця особливість надає актинобактеріям характеристики, схожі на гриби та бактерії, особливо з точки зору міцеліального росту. Тому раніше їх розглядали як проміжну форму між грибами та бактеріями через їхню спорогенність та структуру міцелію, проте таке порівняння є поверхневим, оскільки актинобактерії, як і інші прокаріоти, мають нуклеоїд для організації генетичного матеріалу, а їх клітинна стінка містить пептидоглікан [Stackebrandt et al., 2006].

Актинобактерії населяють різні середовища, включаючи ґрунт, водойми та повітря, а також можуть бути патогенними для рослин, тварин і людей. Вони є одними з найбільш активних деструкторів органічної матерії в ґрунті, сприяючи підтримці поживного циклу та біохімічного складу ґрунту. Цей процес важливий для забезпечення доступності поживних речовин для рослин та інших мікроорганізмів. Розкладання органічної матерії також призводить до формування гумусу, який є ключовим елементом ґрунту, що впливає на його структуру та властивості [Bhatti et al., 2017].

Водночас, актинобактерії мають здатність виробляти біологічно активні речовини, які сприяють підвищенню урожайності, зміцненню рослин проти стресових факторів та поліпшенню якості ґрунту. Переважна більшість даних мікроорганізмів можуть синтезувати індол-3-оцтову кислоту (ІОК) – ауксин, що утворюється в результаті метаболізму L-триптофану, який є фітогормоном, що покращує ріст рослин, стимулюючи проростання насіння, ріст коренів та зростання проростків [Muо et al., 2019]. Окрім цього, актинобактерії можуть солюбілізувати нерозчинні фосфати, що є корисним для росту рослин. У стрептоміцетів цей процес відбувається завдяки синтезу лужних та кислих фосфатаз [Solans et al., 2019].

Актинобактерії належать до однієї з найважливіших груп бактерій, здатних синтезувати сидерофори. Ці прокаріотичні організми синтезують різноманітні сидерофори, які сприяють збільшенню врожайності зернових

культур. Наприклад, штам *Nocardiosis dassonvillei* MB22 підвищує швидкість росту проростків пшениці [Allali et al., 2019]. Актиноміцети, синтезуючи сидерофори, створюють умови “залізного голоду” для фітопатогенів, знижуючи їм доступність  $Fe^{3+}$  і тим самим пригнічуючи їх ріст [Hernández-Montiel et al., 2018]. Також, представники роду *Frankia* можуть фіксувати атмосферний азот у симбіозі з актиноризними рослинами, що дозволяє їм колонізувати ґрунти з низьким вмістом азоту [Sellstedt et al., 2013]. Дослідження показали, що деякі несимбіотичні актинобактерії з родів *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* і *Propionibacteria* також можуть фіксувати азот з повітря. Збагачення ґрунту біодоступним азотом значно підвищує його родючість, сприяючи кращому росту та врожайності рослин [Boukhatem et al., 2022].

Не менш важливою є здатність актинобактерій продукувати антимікробні метаболіти, які допомагають запобігати зараженню ґрунту та рослин [Torres-Rodriguez et al., 2022]. Вони, зазвичай, застосовують декілька антагоністичних стратегій одночасно, включаючи синтез антибіотиків, сидерофорів та літичних ензимів, щоб протистояти фітопатогенам. Багато досліджень підтвердили ефективність актинобактерій у біологічному контролі фітопатогенів. Наприклад, штами *S. bellus* та *S. saprophyticus* можуть солюбілізувати фосфор і калій, а також пригнічувати гриби з роду *Fusarium*, тим самим захищаючи коріння цукрових буряків від гнилі [Aallam et al., 2022].

Актинобактерії також здатні взаємодіяти з еукаріотичними організмами. Вони присутні в екзоскелетах деяких тропічних мурашок, в легенях і шкірі ссавців, а також у коріннях і інших частинах рослин. На відміну від таких родів як *Streptomyces*, *Kineococcus* і *Mycobacterium*, які зустрічаються в різних екосистемах, роди *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Kocuria* і *Rothia* переважно асоційовані з живими організмами. Ці взаємодії можуть бути як корисними, так і шкідливими для господарів. Наприклад, роди *Frankia* і *Micromonospora* утворюють мутуалістичні симбіози, формуючи азотфіксувальні бульбочки на коренях бобових, що є ключовим фактором для фіксації азоту [Kicho et al.,

2010; Trujillo et al., 2010]. Актинобактерії також взаємодіють з мурахами-листорізами, захищаючи їх від патогенних грибів і бактерій за допомогою синтезу валіноміцину, антиміцинів і актиноміцинів. Зокрема, представники роду *Pseudonocardia* підтримують збалансовану систему, що включає гриб *Leucoagaricus gongylophorus*, який є джерелом живлення для мурах. Цей рід актинобактерій виробляє антигрибкові речовини (дентигеруміцини, кандидин і варіанти ністатину), які пригнічують патогенні гриби *Escovopsis spp.*, але не шкодять симбіонту *L. gongylophorus* [Behie et al., 2017].

Крім позитивного впливу, актинобактерії також можуть бути шкідливими для своїх господарів. Наприклад, деякі види з роду *Mycobacterium* є збудниками захворювань, таких як туберкульоз (*Mycobacterium tuberculosis*) та проказа (*M. leprae*), які уражують людей та інших ссавців. У рослин патогенні штами роду *Streptomyces*, зокрема *S. scabies*, мають спільний острів патогенності, що надає їм здатність інфікувати багато видів вищих рослин, викликаючи різноманітні захворювання [Logia et al., 2006].

### **1.1.2. Морфологія актинобактерій**

Актинобактерії забарвлюються за Грамом позитивно, набуваючи фіолетового кольору, що означає наявність у них кислотостійкої клітинної стінки. Діаметр ниток у стрептоміцетів коливається від 0,2 до 2 мкм. Повітряна частина міцелію, яка утворює деяку кількість спор, дає змогу актиноміцетам інтенсивно розмножуватися.

Актинобактерії відзначаються широким спектром морфологічних особливостей, які включають наявність чи відсутність субстратного або повітряного міцелію, різноманітність кольорів міцелію, продукування дифундуючих меланоїдних пігментів, які можуть бути червоними, жовтими, помаранчевими, коричневими, синіми або чорними, залежно від конкретного штаму, умов росту та віку культури (меланоїдні пігменти сприяють виживанню та конкурентоспроможності). Крім того, актинобактерії мають різні характеристики спор [Barka et al., 2015].

Актинобактерії мають спори з різною топологією поверхні, яка може бути гладкою або з бородавками, шорсткою, шипуватою або волосистою [Dietz et al., 1971]. Роди, такі як *Actinoplanes* та *Actinosynnema*, відомі своїми рухомими спорами, в той час як *Thermoactinomyces* унікальна терmostійкими ендоспорами [Cross et al., 1973]. Різні роди актинобактерій мають унікальні структури для формування спор, включаючи склероції у *Chainia*, синнеми у *Actinosynnema*, пухирці у *Frankia*, або безспорові пухирці у *Intrasporangium* [Dietz et al., 1971]. Деякі роди, такі як *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Sporichthya* та *Nocardia spp.*, формують короткі ланцюжки спор, тоді як *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Kitasatospora*, *Streptoverticillium* та деякі *Nocardia spp.* утворюють довгі ланцюжки спор, що можуть містити до 100 одиниць [Jakab et al., 1996].

Кількість спор у споровому ланцюзі широко варіюється від роду до роду. Представники родів *Micromonospora*, *Salinispora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* та *Promicromonospora* утворюють ізольовані спори, тоді як рід *Microbispora* утворює спори подовжніми парами. Представники родів *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Sporichthya* та деякі *Nocardia spp.* мають короткі ланцюжки спор, тоді як представники родів *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Kitasatospora*, *Streptoverticillium* і деякі види нокардій утворюють дуже довгі ланцюжки до 100 спор. І навпаки, види *Frankia* виробляють спорангії, які, по суті, являють собою мішечки зі спорами. Споріві ланцюги стрептоміцетів можна розділити на прямі або звивисті (Rectus-Flexibilis), відкриті петлі (Relinaculam-Apertum), відкриті або закриті спіралі (spira) або мутовчасті [Pridham et al., 1958].

Життєвий цикл актинобактерій розпочинається зі проростання спор, які, розростаючись, утворюють вегетативні гіфи. Ці гіфи потім формують складний вегетативний міцелій з багатьма розгалуженнями. Унікальною характеристикою цих вегетативних гіф є те, що вони збільшуються в розмірах за рахунок потовщення кінчика, на відміну від одноклітинних бактерій, таких як *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli*, у яких подовження клітин відбувається

через включення нового матеріалу в бічну клітинну стінку [Hamedi et al., 2017].

Вегетативні гіфи актинобактерій здатні до експоненціального росту завдяки поєднанню росту верхівки та галуження. Через те, що під час вегетативного росту замість формування нових клітин відбувається створення поперечних перегородок, які ділять гіфи на окремі компартменти, кожен з яких містить копію хромосоми, актинобактерії є унікальними серед бактерій [Claessen et al., 2014; Elliot et al., 2008]. У несприятливих умовах, таких, як дефіцит поживних речовин, вегетативний міцелій актинобактерій автолітично деградує, подібно до процесу запрограмованої смерті клітин, при цьому формуючи спорогенні структури, відомі як повітряні гіфи. У цей період актинобактерії також продукують більшість своїх вторинних метаболітів, включаючи антибіотики, що є захисною реакцією на конкуренцію за поживні речовини в середовищі існування. Повітряні гіфи надають колоніям характерний пухнастий зовнішній вигляд і згодом диференціюються, утворюючи ланцюжки одноядерних спор [Flärdh et al., 2009].

## **1.2. Біологічні особливості морських актинобактерій**

Морські екосистеми є одними з найбагатших та малодосліджених середовищ існування мікроорганізмів, які володіють значним потенціалом у контексті відкриття нових та хімічно різних природних сполук. Ці екосистеми вирізняються великою мікробіологічною різноманітністю, що служить основою для виявлення потенційних медичних препаратів, ефективних у лікуванні складних інфекційних захворювань [Blunt et al., 2018]. Упродовж останніх десятиліть спостерігається значний розвиток у вивченні цих мікроорганізмів, зокрема актинобактерій. Виділено чимало продуцентів нових біологічно активних речовин з різноманітною хімічною будовою. Серед них слід зазначити напірадіоміцини, унікальний клас меротерпеноїдів з різними моделями галогенування, які мають високу інгібуючу активність проти MRSA [Carretero-Molina et al., 2019], а також два нових спіротетронати, лобофорини

L і M, які володіють антибактеріальною дією проти грампозитивних бактерій [Luo et al., 2021] та інші.

Дослідження рідкісних родів морських актинобактерій дають дуже обнадійливі результати. З представників цих родів виділено значну кількість біологічно активних речовин із перспективними властивостями [Dhakal et al., 2017]. Наприклад, з штаму *Actinomadura sp.* АКА43, отриманого з плаваючих частинок на глибині затоки Сагамі Бей (Японія), були отримані три нові тетронатні полікетиди - номіміцини В, С і D, які ефективні проти *Kocuria rhizophila* та *B. subtilis* [Zhang et al., 2021]. На тій же місцевості на глибині 800 метрів був виділений інший штам актинобактерій *Nonomuraea sp.* АКА32, який синтезує аказаміцин з протипухлинною активністю [Yang et al., 2019]. Також з штаму *Nocardiosis sp.* НВ-Ј378 були виділені нокардіопсистини А-С - ангуцикліни з родини полікетидів, які виявили антибактеріальну активність проти MRSA [Xu et al., 2018].

Морські актинобактерії – це група мікроорганізмів, які належать до типу *Actinobacteria* і живуть у морському середовищі. Вони мають ряд біологічних особливостей, які відрізняють їх від ґрунтових актинобактерій, таких як:

- Морфологія. Морські актинобактерії можуть мати різні форми росту, від ниткоподібних до кокоподібних, і утворювати гідрофобні спори на повітряному міцелії. Вони також можуть мати різні пігменти, які надають їм різні кольори, від блідо-жовтого до темно-фіолетового.

- Екологія. Морські актинобактерії зустрічаються у різних морських біотопах, таких як поверхневий шар води, седименти, корали, губки, водорості, молюски та інші безхребетні. Вони можуть адаптуватися до різних умов, таких як температура, солоність, тиск, кисневий режим, рН та наявність органічних речовин.

- Метаболізм. Морські актинобактерії виробляють велику кількість вторинних метаболітів, які мають біологічно активні властивості, такі як антибіотична, протипухлинна, противірусна, протизапальна, біопестицидна,

гормональна та інші. Вони також можуть синтезувати ферменти, пігменти, інгібітори ферментів та інші сполуки, які мають біотехнологічне значення.

Гіперсолоні середовища існування відомі як типові екстремальні середовища, які включають солоні озера, солоні ґрунти та солоні озера. Прикладами родів актинобактерій, виділених із гіперсолоних ґрунтів, що виявляють протигрибкову активність щодо *Fusarium solani*, *Aspergillus nigeri*, *Cryptococcus sp.*, були *Streptomyces alboflavus*, *Nocardia sp.*, *Micromonospora sp.* і *Streptomyces griseoflavus* [Selim et al., 2021].

Актинобактерії були знайдені у незвичайних морських умовах, наприклад у морських глибоководних газогідратних резервуарах і органічних агрегатах, де вони є основними компонентами мікробних спільнот. Морські актинобактерії є дуже важливими мікроорганізмами через їхню значну роль як у біологічних, так і в біотехнологічних сферах застосування. Існує 83 види актинобактерій, що належать до 28 родів, які були виділені з морських джерел, і більшість із них є новими для науки [Selim et al., 2021].

Морські актинобактерії розповсюджені в усіх зонах океану, де вони живуть у водному стовпі, донних відкладах, глибоководних екосистемах, а також у симбіозі з водоростями, губками та іншими морськими істотами. Їх взаємозв'язки з іншими мешканцями моря можуть сприяти унікальній хімічній екології та синтезу нових вторинних метаболітів. Морські актинобактерії ще мало досліджені та використовуються для пошуку нових біологічно активних речовин, а їх видовий склад залишається недостатньо вивченим [Потапенко та ін., 2021].

Морські актинобактерії мають потенціал для продукції вторинних метаболітів, таких як антибіотики та імуносупресори в медицині та ветеринарії. Морське середовище відмінне від ґрунтового, тому морські актинобактерії набувають спеціальних властивостей та адаптацій до специфічних умов морського середовища. Це призводить до того, що морські актинобактерії можуть виробляти нові види вторинних метаболітів, які відрізняються від ґрунтових актинобактерій. Тому морські мікроорганізми

вважаються перспективним джерелом нових біологічно активних метаболітів, таких як макроліди, циклічні пептиди, полікетиди, терпени, алкалоїди та стероїдні алкалоїди [Потапенко та ін., 2021].

### 1.3. Практичне значення морських актинобактерій

Морські актинобактерії мають велике практичне значення, оскільки вони виробляють різноманітні біологічно активні речовини, які можуть застосовуватися в медицині, ветеринарії, сільському господарстві, косметології, харчовій промисловості та інших галузях.

Деякі з цих речовин є антибіотиками, протипухлинними, противірусними, протизапальними, біопестицидами, гормонами росту рослин, пігментами, ферментами, інгібіторами ферментів тощо. Наприклад, актинобактерії можуть виробляти такі антибіотики, як:

- ансаміцин,
- антрациміцин,
- баліюміцин,
- бензастатин,
- бісіндол,
- бутіролактон,
- каліхеаміцин,
- кандіцин,
- карбоміцин,
- кардіоміцин,
- кармоміцин,
- карфураміцин,
- клараміцин,
- дактиноміцин,
- еритроміцин,
- філіпін,
- гаргелліміцин,
- гірсутеллін,
- імідазолін,
- індолокарбазол,
- ісокумарин,
- лінкоміцин,
- ліпофілін,
- мікромоноспораміцин,
- мікротетролід,
- мілбеміцин,
- нігроспорін,
- новобіоцин,
- олеандроміцин,
- олівоміцин,
- остеоміцин,
- пентеноміцин,

- піролізидин,
- плеуромутілін,
- пліваламіцин,
- плівоміцин та інші.

Саме морськими актинобактеріями виробляються наступні антимікробні препарати:

*Абіссоміцин С* – представляє собою новий полікетидний антибіотик поліциклічної структури, який виробляється *Verrucosispora*, морським штамом актинобактерій. Цей засіб ефективно блокує біосинтез пара-амінобензойної кислоти, пригнічуючи біосинтез фолієвої кислоти на більш ранньому етапі, ніж це роблять відомі синтетичні сульфатичні препарати. Абіссоміцин С виявляє високу активність проти грампозитивних бактерій, включаючи клінічні штами багаторезистентного золотистого стафілокока (стійкий до ванкоміцину). Його можна розглядати як потенційний антибактеріальний препарат для боротьби з антибіотикорезистентними мікроорганізмами.

Нова речовина, яку назвали *бонактином BD21-2*, була отримана з рідкісної культури *Streptomyces* sp., яка була ізольована з зразків мілководних відкладень, зібраних на березі Кайлуа на острові Оаху, Гаваї. Бонактин проявляв здатність боротися з різними видами мікроорганізмів, включаючи грампозитивні і грамнегативні бактерії, а також гриби.

Також морський *Streptomyces* sp. синтезує нові антибіотики, які належать до *хлорованих дигідрохінонів*. Ці речовини мають унікальні вуглецеві каркаси, але споріднені з деякими вже відомими метаболітами напірадіоміцину. Дані молекули володіють потужною дією проти бактерій та ракових клітин.

До фарнезильованих дибензодіазепінонів належить *діазепіноміцин*, який виробляється мікроорганізмом *Micromonospora*. Ця речовина має властивості, які допомагають боротися з бактеріями, запаленнями та пухлинами. Вона показує сильну цитотоксичну дію *in vitro* і здатна знищувати гліому, рак молочної залози та простати у мишей *in vivo*.

Новий антигібікліноновий антибіотик, який називається *фрігоцикліноном*, був отриманий з *Streptomyces griseus* NTK 97. Ця речовина має складну структуру, яка складається з тетрагоміцинового фрагмента, з'єднаного з амінодезоксичукром

осаміном через С-глікозидний зв'язок. Фрігоциклінон має властивості, які дозволяють йому знищувати грампозитивні бактерії [Timmermans et al., 2017].

Нова речовина, яка належить до триазолопіримідинів і називається *есраміцином*, була отримана з *Streptomyces sp.* Ця сполука має властивості, які дозволяють їй боротися з різними видами бактерій, як грампозитивними, так і грамнегативними, з мінімальною інгібуючою концентрацією 2–8 мкг/мл [El-Gendy et al., 2008].

*Маринопіроли* – це складні органічні речовини, які мають два пірольових кільця, з'єднані між собою, і багато атомів хлору. Вони були виділені з морської бактерії *Streptomyces sp.* Маринопіроли володіють високою антибактеріальною дією і можуть зупиняти ріст *S. aureus*, який не чутливий до багатьох інших антибіотиків, включаючи метицилін.

*Лінаміцини* – це сполуки, які містять хлор і належать до класу бісіндолпіролів. Вони були отримані з морської актинобактерії *Marinispora sp.* Їх здатність вбивати різні мікроорганізми була перевірена на 11 видах хвороботворних бактерій. Виявилося, що лінаміцини ефективні проти бактерій, які мають різну будову клітинної стінки – грампозитивних і грамнегативних, тобто мають широкий спектр дії. Особливо цінним є те, що лінаміцини можуть знищувати бактерії, які стали стійкими до інших антибіотиків, наприклад, *S. aureus*, який стійкий до метициліну, та *Enterococcus faecium*, який стійкий до ванкоміцину [Strieker et al., 2010].

*Гімаломіцини А і В* – це антибіотики, які належать до групи антрациклінів, продукуються морською бактерією *Streptomyces sp. 6921*, яка була виділена з морських відкладень біля острова Маврикій. Вони дуже добре впливають на різні види бактерій. Гліціапіроли А, В та С - це нові антибіотики, які мають у своєму складі піроль і сесквітерпен. Вони були виділені з іншої морської бактерії *Streptomyces sp. NPS008187*.

*Кабоксаміцин* – це новий вид антибіотика, який має бензоксазолове кільце в своїй молекулі. Він був знайдений за допомогою спеціального методу аналізу в речовині – ВЕРХ-діодного скринінгу в екстрактах виділених з бактерії

*Streptomyces sp. NTK 937*. Ця бактерія була взята з морського дна біля Канарських островів. Назва кабоксаміцин складається з початкових літер місця, де була зібрана бактерія, і літер, які відображають її хімічну будову. Кабоксаміцин може гальмувати ріст різних бактерій, які мають позитивну реакцію на фарбування Грамом, а також деяких видів ракових клітин, а саме, клітин карциноми молочної залози (MCF7), аденокарциноми шлунка (AGS) та гепатоцелюлярної карциноми (Нер G2). Крім того, кабоксаміцин може інгібувати дію фосфодіестерази - ферменту, який розщеплює фосфатні групи в молекулах.

*Ліпопептиди* – це циклічні сполуки, які складаються з пептидного кільця і жирної кислоти. До них належать три різних типів: ітуріни, фенгіціни і сурфактіни. У них пептидне кільце містить сім (сурфактіни і ітуріни) або десять (фенгіціни) амінокислот, які з'єднані з  $\beta$ -гідрокси- (сурфактіни і фенгіціни) або  $\beta$ -аміно- (ітуріни) жирною кислотою з 10 до 18 атомів вуглецю. У кожному типі ліпопептидів є підтипи, які відрізняються за амінокислотою, що знаходиться в певній позиції в кільці. Деякі ліпопептиди, які виробляються морськими бактеріями, мають антибіотичні властивості. Наприклад, таурамамід, галобацілін і метилгалобацілін - це циклічні ліпопептиди нерибосомального походження. Таурамамід ефективно пригнічує ріст грампозитивної бактерії *Enterococcus sp.*, а також показує активність проти MRSA (метицилінорезистентних *Staphylococcus aureus*; MIC 200 мкг/мл) і *Candida albicans* (MIC 50 мкг/мл).

Два циклічні ліпопептиди, галобацілін і метилгалобацілін, були отримані з бактерій, які живуть у морському дні Каліфорнійської затоки в Мексиці. Галобацілін є також потужним біосурфактантом, який знижує поверхневий натяг рідини. Цей антибіотик здатний зупиняти розмноження ракових клітин товстої кишки людини (HCT-116) з IC<sub>50</sub> 0,98 мкг/мл і має подібну, але слабшу, ніж сурфактин (відомий антибіотик-сурфактант, який виробляється наземними штамми *Bacillus subtilis*), дію проти деяких бактерій, таких як *S. aureus*, *Proteus vulgaris* і *Enterococcus faecalis*.

*Бізантрахінон* – це новий вид антибіотика, який був виділений з бактерії *Streptomyces* sp. Він був протестований на різних бактеріях, які викликають захворювання у людей і стали стійкими до багатьох інших антибіотиків. Показав дуже добрі результати проти бактерій *E. faecium*, які не реагують на ванкоміцин, і *S. aureus*, які не реагують на метицилін або тетрациклін. Проявляв бактерицидну дію щодо цих мікроорганізмів з мінімальною інгібуючою концентрацією 0,22, 0,46 та 1,8 мкМ відповідно [Socha et al., 2006].

*Богорол А* – це поліпептид, який добре діє проти *S. aureus*, які не чутливі до метициліну (MRSA), і ентерококів, які не чутливі до ванкоміцину (VRE), а також помірно проти *E. coli*.

З морської актинобактерії *Nocardiosis* sp. отримали тіопептидний антибіотик *TP-1161*. Цей антибіотик дуже ефективний *in vitro* проти грампозитивних бактерій, які зустрічаються у лікарнях (MIC від 0,25 до 4 мкг/мл), що порівнянно з ванкоміцином. TP-1161 також зупиняє ріст бактерій, які стійкі до ванкоміцину, наприклад *E. faecalis* і *E. faecium*, з MIC 1 мкг/мл [48].

Крім того, існує багато інших потенційних препаратів, які знаходяться на стадії дослідження, наприклад:

- *Саліноспорамід А* (Salinosporamide A) – протипухлинний препарат, який виробляється морською актинобактерією *Salinispora tropica*. Він показав ефективність проти деяких видів раку, таких як мієлома, лімфома та рак молочної залози. Препарат знаходиться на стадії клінічних випробувань під назвою Марізоміб (Marizomib).

- *Ліпоміцин* (Lipomycin) – антибіотик, який виробляється морською актинобактерією *Streptomyces* sp. Він має активність проти грампозитивних бактерій, в тому числі метицилін-резистентних *S. aureus* (MRSA). Препарат знаходиться на стадії розробки під назвою Ліпокін (Lipoquin).

- *Ларгазол* (Largazole) – протипухлинна сполука, яку виробляє морська актинобактерія *Salinispora arenicola*. Вона інгібує ензим гістон деацетилазу, який регулює експресію генів, пов'язаних з розвитком раку. Вона показала

ефективність проти деяких видів раку, таких як рак яєчників, рак шлунка та рак простати .

- *Лабіринтопептини* (Labyrinthopeptins) – антибіотики, які виробляються морською актинобактерією *Actinomadura namibiensis*. Вони мають активність проти грампозитивних бактерій, в тому числі ванкоміцин-резистентних *Enterococcus faecium* (VRE). Вони також мають противірусну активність проти вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) та вірусу гепатиту С (ВГС).

- *Марфеїн* (Marfeyin) – протипухлинна сполука, яку виробляє морська актинобактерія *Streptomyces* sp. Вона інгібує ензим тирозин кіназу, який стимулює ріст та розповсюдження ракових клітин. Вона показала ефективність проти деяких видів раку, таких як рак мозку, рак шкіри та рак щитоподібної залози.

## 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Робота виконана на базі Біотехнологічного та науково-навчального центру Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

У ході дослідження був використаний штам *Streptomyces ambofaciens* Myt7 з музею культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, виділений співробітником кафедри к.б.н. Коротаєвою Надією Володимирівною з поверхні мушлі мідій, ізольованих з Чорного моря.

### 2.1. Культивування штаму Myt7 та штамів індикаторів

Штам Myt7 - актиноміцет ізольований з поверхні мушлі мідії Чорного моря (*Mytilus galloprovincialis*). Штам було ідентифіковано як *Streptomyces ambofaciens* на підставі ідентифікації секвенованої послідовності 16S rRNA.

Для культивування штаму Myt7 використовували середовище Гаузе 2 та рідкі живильні середовища різного компонентного складу (табл. 5), склад яких було підбрано за літературними джерелами та в результаті оптимізації.

Культивування здійснювали на шейкері-інкубаторі Innova 43R NewBrunswick (England) у флаконах з 50 мл середовища при 180 об/хв. Культивування здійснювали протягом 10 діб при температурі +28,0 °С. Засів живильних середовищ проводили посівним матеріалом, вирощеним в рідкому середовищі Гаузе 2 протягом 3 діб на шейкері-інкубаторі Innova 43R NewBrunswick (England) при температурі +28,0 °С, в кількості 5,0 % від обсягу середовища.

Для визначення антагоністичної активності штаму Myt7 за умов його культивування у різних живильних середовищах використовували штами-індикатори з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова. В роботі були використані наступні штами-індикатори: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kucoria rhizophila* DSM 348 та *Candida albicans* ATCC 18804. Штами культивували на МПА при 37 °С, а С.

*albicans* ATCC 18804 – при 28 °С, та зберігали при 4 °С.

Усі експерименти із індикаторними штамами проводили на середовищі LB наступного складу (г/л): пептон – 15,0, дріжджовий екстракт – 10,0, хлорид натрію – 5,0, агар -11,0 г/л.

Для отримання нічної культури бактерій, добові культури індикаторних штамів, інкубованих при 37 °С та 28 °С, пересівали мікробіологічною петлею зі скошеного агару у колбочки з 5 мл рідкого середовища LB.

## **2.2. Оптимізація складу живильних середовищ для культивування штаму Mvt7**

Для проведення оптимізації як базові використали середовища «Промислове 1» (надане підприємством «НАУКОВО-ВИРОБНИЧЕ ОБ'ЄДНАННЯ «АГРОБІОІНОВАТІКА») та Гаузе 2.

Як план експерименту використовувався греко-латинський квадрат з чотирма чинниками на чотирьох рівнях варіювання, де кожен з рівнів чинників з'являється тільки один раз в кожному рядку і в кожному стовпці, і тільки один раз вони поєднуються в парі між собою для середовища «Промислове 1», та греко-латинський квадрат з трьома чинниками на трьох рівнях варіювання для середовища Гаузе 2.

Вибір ґрунтувався на тому, що греко-латинські квадрати дозволяють виявити найбільш ефективні поєднання чинників без урахування взаємодій між чинниками і мінімізувати кількість розрахунків та лабораторних маніпуляцій (табл. 1 - 4).

Таблиця 1

**Матриця планування експерименту відповідно плану  
на греко-латинських квадратах 4×4**

A	B			
	b1	b2	b3	b4
a1	c1 d1	c2 d2	c3 d3	c4 d4
a2	c2 d3	c1 d4	c4 d1	c3 d2
a3	c3 d4	c4 d3	c1 d2	c2 d1
a4	c4 d2	c3 d1	c2 d4	c1 d3

Як чинники оптимізації використовували: кукурудзяний екстракт (A), екстракт солоду (B), меляса (C), дріжджовий екстракт (D). Шаг варіювання чинників оптимізації наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

**Концентрації компонентів живильних середовищ (г/л), які використали  
у дисперсійному аналізі, адаптованому для плану на греко-латинських  
квадратах для середовища «Промислове 1»**

Чинники	Концентрації компонентів живильних середовищ (г/л)			
	Рівень 1	Рівень 2	Рівень 3	Рівень 4
Кукурудзяний екстракт	25	20	15	10
Екстракт солоду	20	15	10	5
Меляса	26	19	12	5
Дріжджовий екстракт	15	10	5	0

Таблиця 3

**Матриця експерименту для трьох чинників для трьох рівнів за принципом  
греко-латинських квадратів**

A	B		
	b1	b2	b3
a1	c1	c2	c3
a2	c2	c3	c1
a3	c3	c1	c2

Як чинники оптимізації використовували: глюкозу (А), пептон (В) та дріжджовий екстракт (С). Шаг варіювання чинників оптимізації наведено у таблиці 4.

Таблиця 4

**Концентрації компонентів живильних середовищ (г/л), які використали у дисперсійному аналізі, адаптованому для плану на греко-латинських квадратах для середовища «Гаузе 2»**

Чинники	Концентрації компонентів живильних середовищ (г/л)		
	Рівень 1	Рівень 2	Рівень 3
Глюкоза	28	21	14
Пептон	11	8,5	6
Дріжджовий екстракт	8	6	4

Як незмінні компоненти використовували  $\text{KNO}_3 - 3 \text{ г/л}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,5 \text{ г/л}$ ,  $\text{MgSO}_4 - 0,5 \text{ г/л}$ .

Оптимізацію живильних середовищ за допомогою дисперсійного аналізу, адаптованого за планом на греко-латинських квадратах, проводили за класичною методикою [Васильєва, Ямборко, 2022].

Як показник оптимізації використовували діаметр зон лізису (мм).

### 2.3. Статистичний аналіз отриманих результатів

Значимість ефектів перевіряли за критерієм Фішера, при цьому орієнтувалися на нерівність:

$$\frac{S_{\text{чинників рiальна}}^2}{S_{\text{помилки}}^2} < F_{1-p}(f_1, f_2) \rightarrow H_0$$

де  $f_1, f_2$  — числа ступенів свободи, рівні  $f_1 = n-1$ ,  $f_2 = (n-1)(n-2)$ , а  $p$  — рівень значимості. Розрахункове значення критерію Фішера порівнювали з табличним значенням цього критерію. Якщо якесь дисперсійне співвідношення виявлялося більше табличного, то вплив для цього чинника вважали значущим (тобто приймали альтернативну гіпотезу ( $H_1$ )) [Зедгінідзе, 1976].

Розрахунок показника ефекту впливу кожного чинника на кожному рівні, як різницю між вибіркоvim середнім та загальним середнім, проводили за наступною формулою:

$$\text{ефект впливу} = \bar{x}_i - \bar{X}$$

де  $\bar{x}_i$  - середнє значення по кожному рівню кожного фактора,  $\bar{X}$  - загальнє середнє для всієї вибірки.

#### **2.4. Дослідження антагоністичної активності штаму Myt7 методом лунок**

Для визначення антагоністичної активності штаму Myt7 використовували середовища, наведені у таблиці 5 та середовища, отримані в ході оптимізації.

Визначення антагоністичної активності здійснювали на середовищі LB (0,7 %) методом лунок. Хід роботи полягав у наступному: на застиглому поживному середовищі LB, засіяним тест-культурою (одним з умовно-патогенних штамів), вирізали лунки діаметром 8 мм за допомогою стерильного пробійника. У лунки вносили культуральну рідину досліджуваного штаму.

Облік результатів здійснювали через 24 годин після інкубації при оптимальних для кожної групи мікроорганізмів температурах, вимірюючи діаметр зон відсутності росту індикаторних штамів навколо лунок з культуральною рідиною, отриманою при культивуванні штаму Myt7. Чим більший діаметр зони, тим вища антагоністична активність вторинних метаболітів досліджуваного штаму.

Таблиця 5

**Склад живильних середовищ, які були використані для дослідження антагоністичної активності досліджуваного штаму актинобактерій (г/л)**

	кукурудзяний екстракт	водорозчинний крахмаль	екстракт солоду	меляса	дріжджовий екстракт	пептон	глюкоза	(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	KNO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CaCO <sub>3</sub>	CaCl <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NaCl	бульйон Хоттінгера
Промислове 1	25.0		20.0	25.0	15.0	7.0			7.0	5.0	5.0					
Промислове 2	15.0			12.0				1.5		5.0	1.5					
Середовище Гаузе 2						5,0	10,0								5,0	0,30
Середовище 1.7	15.0		15.0	19.0	10.0				7.0		0,5					
Середовище 2.7	15.0		15.0	12.0					7.0		0,5					
Середовище 3.7	15.0		15.0	12.				1,5		5.0	0,5					
Середовище 4.5					8.0	6.0	21.0		2.0	0,5	1.0					
Середовище 5.5					4.0	8,5	28.0		2.0	0,5	1.0					
Середовище 15							15,6			0,8		4.2	2.0	2.0		
Середовище 10	10.0						10.0		1.0			5.0			5.0	
Середовище 6613		20,0			2.5				4.0			5.0			0.5	

## 2.5. Пошук кластерів генів з використанням antiSMASH

Для аналізу кластерів генів, що кодують вторинні метаболіти, в геномі *Streptomyces ambofaciens* Myt7 використовувався сервер antiSMASH (Antibiotics and Secondary Metabolites Analysis Shell) (<https://antismash.secondarymetabolites.org>).

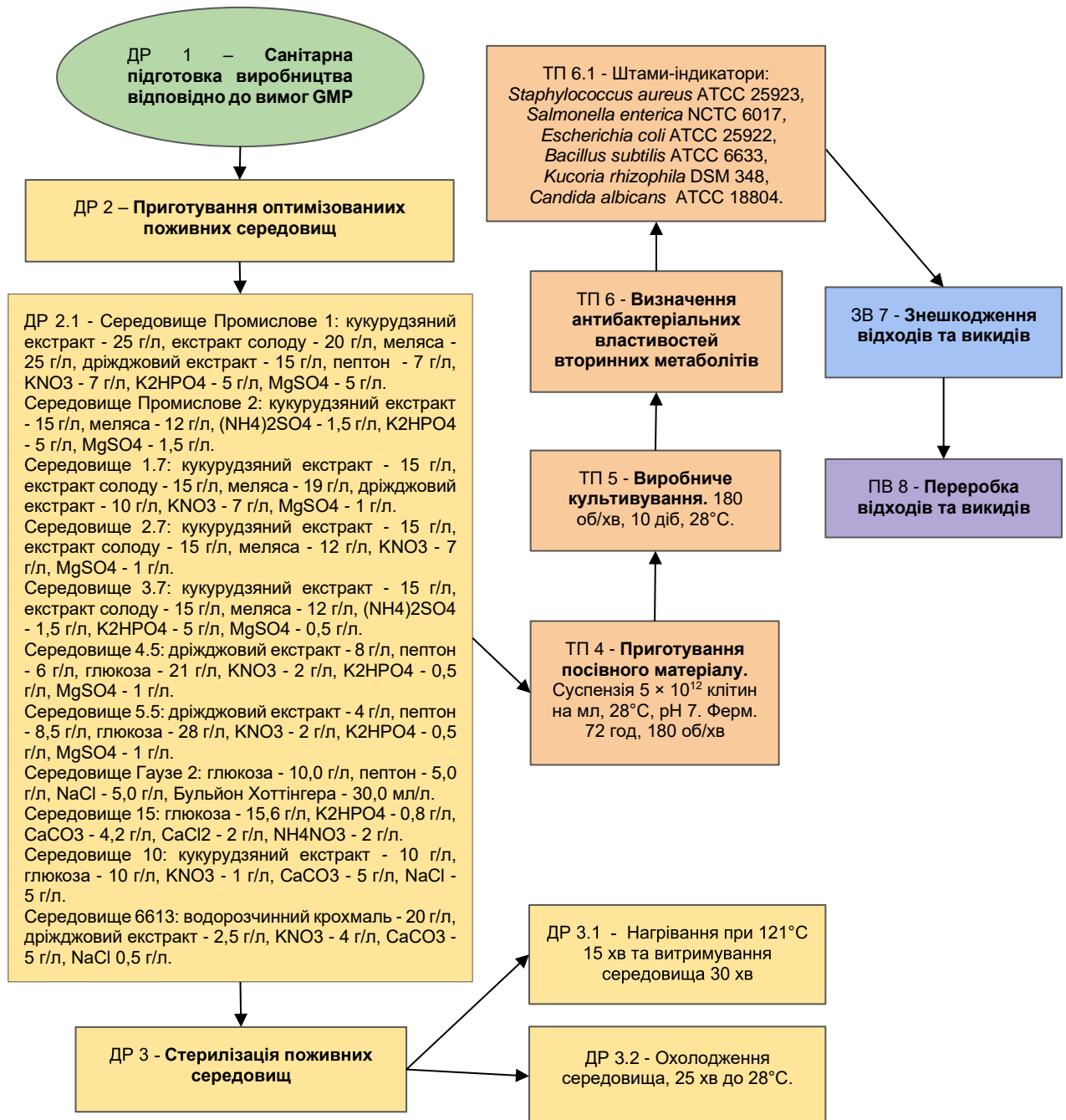
AntiSMASH – це інструмент для виявлення та розпізнавання кластерів генів, які відповідають за синтез вторинних метаболітів у мікроорганізмах.

Для пошуку можливих кластерів генів вторинних метаболітів у antiSMASH використовуються приховані моделі Маркова (pHMM) - статистичні моделі, які базуються на аналізі та вирівнюванні множинних послідовностей сигнатурних білків та доменів, завдяки чому вони ефективні для знаходження віддалених гомологів. Генні кластери можуть бути визначені шляхом пошуку збігів pHMM певного гена, які знаходяться на відстані менше за 10 kbp. Залежно від типу, генні кластери можуть розширюватися на ділянки довжиною від 5 до 20 kbp з обох боків від розташування pHMM даного гена. Якщо кластери розміщені дуже близько, вони можуть створювати гібридні моделі чи перекриватися.

Для аналізу геному у antiSMASH можна використовувати як геноми з бази даних GenBank, вводячи код доступу для цього геному, так і завантажувати геном досліджуваного мікроорганізма у форматі fasta. Останньою версією є antiSMASH 7.0, яка містить 81 тип кластерів генів, а також надає більш докладну інформацію про хімічну структуру вторинних метаболітів та регуляцію кластерів генів. AntiSMASH застосовує спеціальні правила, які базуються на тому, які компоненти повинні бути присутніми в певній ділянці генома, щоб утворювати біосинтетичний кластер генів. Цими правилами є прихована марківська модель, яка саме визначає послідовність даних, яка не є безпосередньо спостережуваною, але існують інші дані, які від цієї послідовності залежать. Найкраще antiSMASH виявляє кластери генів PKS I та II типів, NRPS, а також гібридні кластери PKS/NRPS.

## 2.6 Біотехнологічна схема отримання вторинних метаболітів *Streptomyces ambofaciens* Myt7

Під час дослідження розроблено технологічну схему процесу оптимізації складу поживних середовищ для культивування морських актинобактерій. Етапи біотехнологічного процесу представлено на рис. 1.



**Рис. 1. Технологічна блок-схема оптимізації складу поживних середовищ для культивування морських актинобактерій**

## ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

Санітарна підготовка виробництва включає підготовку виробничого персоналу, виробничих приміщень, технологічного обладнання, підготовку миючих та дезінфікуючих засобів. А також, підготовку вентиляційного повітря для чистих приміщень та підготовку очищеної води.

## ДР 2 Приготування оптимізованих поживних середовищ

Оптимізацію живильних середовищ проводили за класичною методикою за допомогою дисперсійного аналізу, адаптованого за планом на греко-латинських квадратах. Як базові використали середовища «Промислове 1» та Гаузе 2.

### ДР 2.1 Склад оптимізованих поживних середовищ

Склад оптимізованих поживних середовищ представлений у табл. 5.

## ДР 3 Стерилізація поживного середовища

ДР 3.1 Нагрівання при 121 °С 15 хв та витримування середовища 30 хв

ДР 3.2 Охолодження середовища, 25 хв до 28 °С.

## ТП 4 Приготування посівного матеріалу

Для отримання інокуляту *Streptomyces ambofaciens* Myt7, що зберігався в колекції кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології, попередньо висівали на поверхню поживного агару, інкубували при температурі 37 °С протягом 24 год та змивали стерильним фізіологічним розчином таким чином, щоб отримати суспензію клітин щільністю  $10^{12}$  мікробних тіл в 1 мл. 2,5 мл інокуляту вносили в 50 мл середовища Гаузе 2 та культивували досліджений штам протягом 3 діб на шейкері-інкубаторі Innova 43R NewBrunswick (England) при температурі +28,0 °С для збільшення біомаси.

## ТП 5 Виробниче культивування

5% від обсягу культурального середовища вносили в кожне оптимізоване середовище, склад яких представлений в табл. 5, обсягом у 50 мл. Культивування здійснювали на шейкері-інкубаторі Innova 43R NewBrunswick (England) у флаконах з 50 мл середовища при 180 об/хв протягом 10 діб при температурі +28,0 °С.

## ТП 6 Визначення антибактеріальних властивостей вторинних метаболітів

Визначення антагоністичних властивостей вторинних метаболітів, виділених штамом Mut7 під час росту на оптимізованих середовищах, здійснювали на середовищі LB (0,7 %) засіяним тест-культурою (одним з штамів-індикаторів) методом лунок. Облік результатів здійснювали через 24 годин після інкубації при оптимальних для кожної групи мікроорганізмів температурах, вимірюючи діаметр зон відсутності росту індикаторних штамів.

### ТП 6.1 Штами-індикатори

Для Дослідження були використані такі штамми-індикатори: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kucoria rhizophila* DSM 348, *Candida albicans* ATCC 18804.

### ЗВ 7 Поводження з відходами та викидами

Після завершення виробничого процесу необхідно утилізувати такі відходи: промивні води, миючі та дезінфікуючі розчини, дефектну первинну тару, використані фільтрувальні матеріали, посівний матеріал, який не пройшов перевірку на стерильність тощо.

### ПВ 8 Переробка відходів та викидів

Умовно чиста вода, яка подається в сорочку ферментатора та сівалку для охолодження культурального середовища, може бути повторно використана шляхом доочищення цієї води за допомогою фільтрації.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Визначення здатності досліджуваного штаму до продукування антимікробних речовин на середовищах різного складу

На першому етапі дослідження здійснювали культивування штаму *Streptomyces ambofaciens* Mut7 на мінеральних середовищах різного складу. Аналізуючи компоненти, які входять у склад даних середовищ, можна відмітити роль кожного з них у наступному:

##### *Середовище Промислове 1:*

- Кукурудзяний екстракт (25 г/л): багатий на вуглеводи та вітаміни, сприяє росту бактерій.
- Екстракт солоду (20 г/л): забезпечує амінокислотами, вуглеводами та вітамінами для росту.
- Меляса (25 г/л): джерело цукрів, які є легкодоступними для мікроорганізмів.
- Дріжджовий екстракт (15 г/л): є джерелом азоту, вітамінів групи В та мінералів.
- Пептон (7 г/л): забезпечує азот у формі легкозасвоюваних пептидів.
- $KNO_3$  (7 г/л): джерело азоту для синтезу амінокислот.
- $K_2HPO_4$  (5 г/л) та  $MgSO_4$  (5 г/л): мінеральні солі, які підтримують іонний баланс та функціонування ферментів.

##### *Середовище Промислове 2:*

- $(NH_4)_2SO_4$  (1,5 г/л): альтернативне джерело азоту, яке може використовуватися бактеріями.

##### *Середовище 1.7, 2.7, 3.7:*

- $MgSO_4$  (1 г/л): зменшена концентрація порівняно з Промисловим 1 для оптимізації метаболічних процесів.

##### *Середовища 4.5 та 5.5:*

- Глюкоза (21 г/л та 28 г/л): основне джерело енергії.
- $K_2HPO_4$  (0,5 г/л): зменшена концентрація фосфату для регулювання рН середовища.

*Середовище Гаузе 2:*

- NaCl (5 г/л): підтримує осмотичний баланс.
- Бульйон Хоттінгера (30,0 мл): комплексне поживне середовище, яке містить білки та інші поживні речовини.

*Середовище 15:*

- CaCO<sub>3</sub> (4,2 г/л): для нейтралізації кислот, що утворюються під час метаболізму.
- CaCl<sub>2</sub> (2 г/л): джерело кальцію для підтримки клітинної стінки та сигнальних шляхів.
- NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (2 г/л): ще одне джерело азоту.

*Середовище 10:*

- CaCO<sub>3</sub> (5 г/л): вища концентрація для ефективнішої нейтралізації кислотності.

*Середовище 6613:*

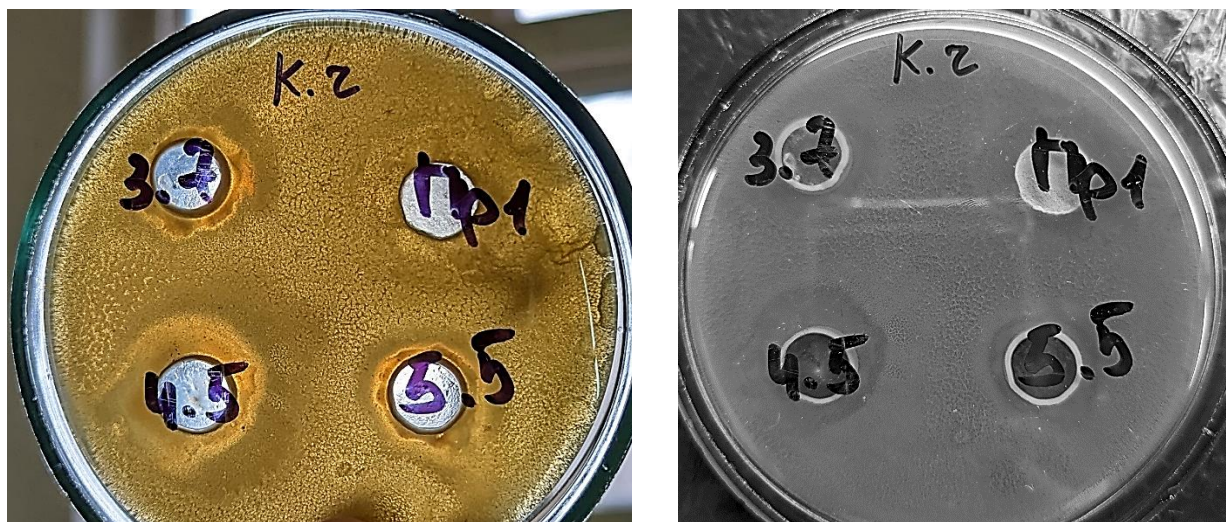
- Водорозчинний крохмаль (20 г/л): джерело вуглеводів, яке бактерії можуть використовувати повільніше, ніж глюкозу.

Залежно від середовища культивування актинобактерії *Streptomyces ambofaciens* Mut7 виробляли різні за природою та кількістю вторинні метаболіти з антибактеріальними властивостями, для оцінки яких надосадові рідини було поміщено у відповідні лунки на середовище LB з тест-штамами умовно-патогенних мікроорганізмів. Отримані результати представлені в таблиці 6, а також на оригінальних фотографіях, виконаних автором роботи, зазначених як Рис. 2-6.

**Зони затримки росту тест-штамів умовно-патогенних мікроорганізмів на досліджуваних середовищах**

3ЗР тест-штаму, мм Середовище	<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Kocuria rhizophila</i> DSM 348	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 27853
Промислове 1	-	13±0,7	-	9±0,8	-
Промислове 2	12±1,0	-	13±0,8	-	-
Середовище 1.7	-	-	-	11±0,7	-
Середовище 2.7	-	12±0,9	-	12±0,4	-
Середовище 3.7	-	-	11±1,2	-	-
Середовище 4.5	-	-	13±1,4	-	-
Середовище 5.5	-	-	10±0,4	-	13±0,8
Гаузе 2	-	-	-	-	-
Середовище 10	-	-	-	-	-
Середовище 15	10±0,9	-	-	-	-
Середовище 6613	-	10±1,0	-	-	11±1,0

Примітка: 3ЗР – зона затримки росту.



**Рис. 2. 3ЗР *Kocuria rhizophila* DSM 348**

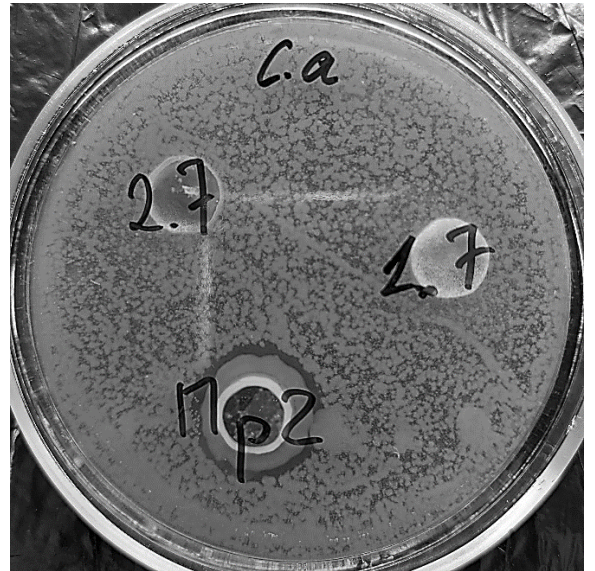
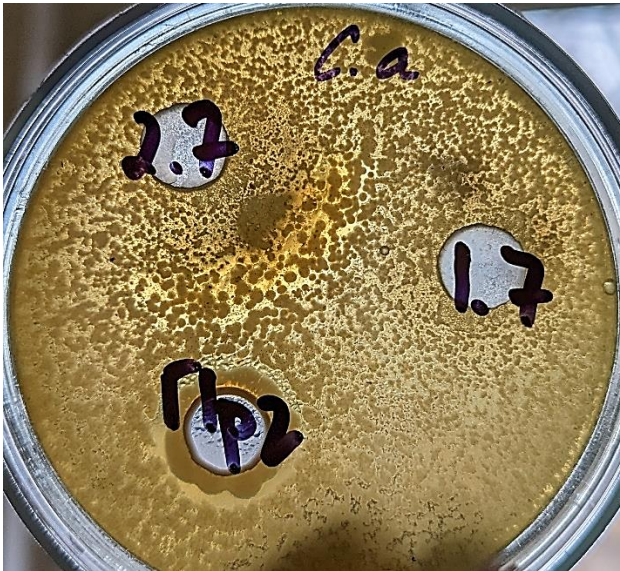


Рис. 3. 3ЗР *Candida albicans* ATCC 18804

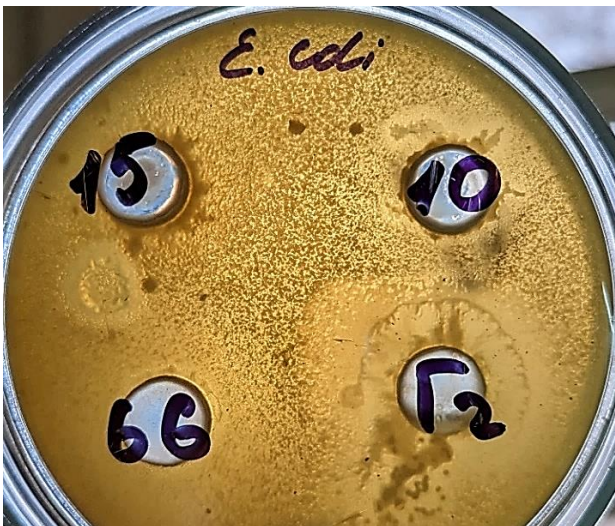
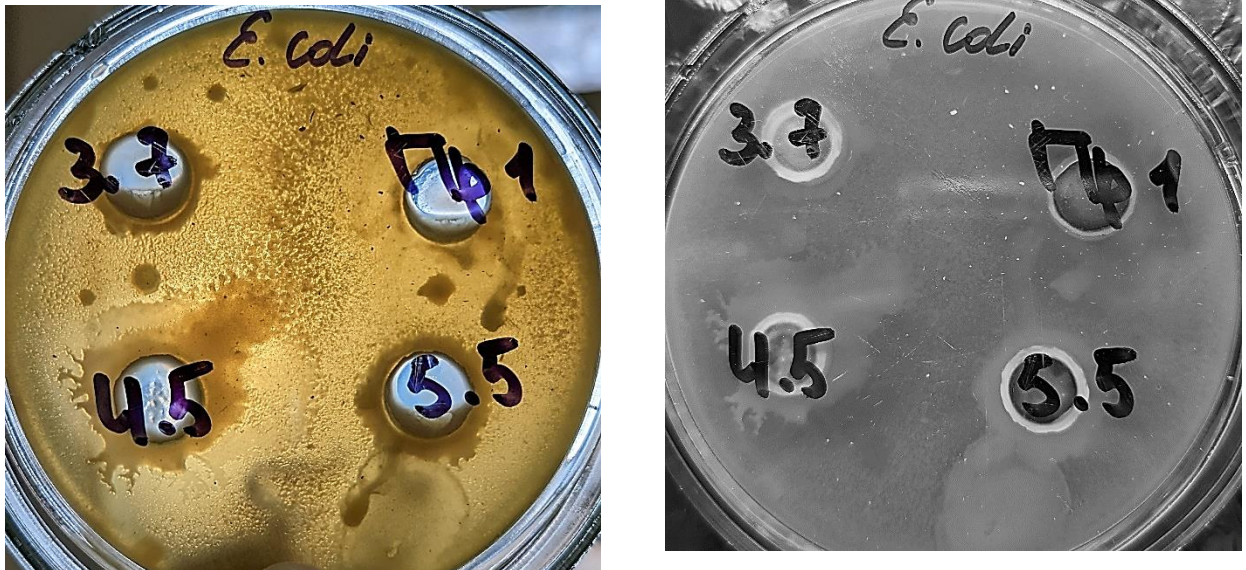


Рис. 4. 3ЗР *Escherichia coli* ATCC 25922 (середовища 10,15,6613 та Гаузе 2)



Рис. 5. 3ЗР *Escherichia coli* ATCC 25922 (середовища 1.7,2.7,Промислове2)



**Рис. 6. ЗЗР *Escherichia coli* ATCC 25922 (середовища 3.7, 4.5, 5.5, Промислове 1)**

Актинобактерії мають різні вимоги до поживних середовищ. Вони можуть розщеплювати білки, сечовину і прості азотисті речовини. Для актинобактерій найкращими джерелами вуглецю є глюкоза, мальтоза, крохмаль, гліцерин або маніт. Актинобактерії, подібно до більшості прокаріотів, найкраще ростуть при нейтральному рН, але деякі з них можуть розвиватися при кислому або лужному рН. Щодо кисню, актинобактерії переважно є аеробними, але деякі патогенні види є анаеробними або мікроаерофільними.

У результаті дослідження встановлено, що при рості на різних середовищах досліджений штам актинобактерій продукував різну кількість вторинних метаболітів, що пригнічували ріст умовно-патогенних мікроорганізмів. Так, після культивування досліджуваного штаму на середовищі Промислове 1 пригнічувався ріст *Escherichia coli* ATCC 25922 та *Bacillus subtilis* ATCC 6633, їх зона затримки росту складала  $13 \pm 0,7$  мм та  $9 \pm 0,8$  мм відповідно.

Після вирощування досліджуваного штаму на середовищі Промислове 2 пригнічувався ріст *C. albicans* ATCC 18804 та *K. rhizophila* DSM 348, їх зона затримки росту складала  $12 \pm 1,0$  мм та  $13 \pm 0,8$  мм відповідно.

Після культивування досліджуваного штаму на середовищі 2.7 пригнічувався ріст *E. coli* ATCC 25922 та *B. subtilis* ATCC 6633, зони затримки їх росту складала  $12\pm 0,9$  мм та  $12\pm 0,4$  мм відповідно.

Після вирощування досліджуваного штаму на середовищі 5.5 пригнічувався ріст *K. rhizophila* DSM 348 та *P. putida* ATCC 27853, їх зона затримки росту складала  $10\pm 0,4$  мм та  $13\pm 0,8$  мм відповідно.

Після культивування досліджуваного штаму на середовищі 6613 пригнічувався ріст *E. coli* ATCC 25922 та *P. putida* ATCC 27853, їх зона затримки росту складала  $10\pm 1,0$  мм та  $11\pm 1,0$  мм відповідно.

Після вирощування досліджуваного штаму на середовищах 1.7, 3.7, 4.5 та 15 спостерігається пригнічення тільки одного виду патогенних мікроорганізмів, а саме *B. subtilis* ATCC 6633 ( $11\pm 0,7$  мм), *K. rhizophila* DSM 348 ( $11\pm 1,2$  мм;  $13\pm 1,4$  мм) та *C. albicans* ATCC 18804 ( $10\pm 0,9$  мм) відповідно.

За даними таблиці, можна зробити висновок, що не виявлено середовища, яке було б оптимальним для отримання метаболітів, які пригнічують максимальну кількість умовно-патогенних штамів, однак можна відзначити на якому середовищі отримували максимальну зону затримки росту кожного штаму-індикатору: для *C. albicans* ATCC 18804 найбільша зона затримки росту була на середовищі Промислове 2 і складала  $12\pm 1,0$  мм; для *E. coli* ATCC 25922 найбільша зона затримки росту була на середовищі Промислове 1 і складала  $13\pm 0,7$  мм; для *K. rhizophila* DSM 348 найбільша зона затримки росту була на середовищі 4.5 і складала  $13\pm 1,4$  мм; для *B. subtilis* ATCC 6633 найбільша зона затримки росту була на середовищі 2.7 і складала  $12\pm 0,4$  мм; для *P. putida* ATCC 27853 найбільша зона затримки росту була на середовищі 5.5 і складала  $13\pm 0,8$  мм.

### 3.2. Оптимізація живильного середовища для штаму Mut7 з метою підвищення його антагоністичної активності при використанні дисперсійного аналізу

З метою визначення найбільш впливових чинників та їх граничних концентрацій використали метод дисперсійного аналізу, адаптованого для плану на греко-латинських квадратах. Як показник оптимізації використовували розмір зон лізису (мм). Отримані значення наведені у вигляді фактичних даних (табл. 7).

Таблиця 7

**Антагоністична активність штаму Mut7 в кожному досліді (комбінація чинників відповідає матриці планування) по відношенню до штамів-індикаторів при оптимізації складу середовища «Промислове 1»**

№ досліду	Комбінація чинників	Зона лізису, мм					
		<i>K. rhizophila</i> DSM 348	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	<i>S. enterica</i> NCTC 6017	<i>P. putida</i> КТ 2440
1	a1b1c1d1	4,0	2,5	1,0	1,2	0,0	0,0
2	a1b2c2d2	3,5	0,0	1,7	1,0	0,0	0,0
3	a1b3c3d3	0,0	3,0	1,0	0,7	0,0	2,0
4	a1b4c4d4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5
5	a2b1c2d3	5,5	3,5	1,0	0,7	0,0	0,0
6	a2b2c1d4	4,5	5,5	1,5	1,0	0,0	2,5
7	a2b3c4d1	0,0	0,0	2,0	1,3	0,0	0,0
8	a2b4c3d2	3,0	2,5	0,0	0,0	0,0	3,0
9	a3b1c3d4	2,5	2,5	5,0	4,2	2,0	2,5
10	a3b2c4d3	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5
11	a3b3c1d2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	a3b4c2d1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
13	a4b1c4d2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14	a4b2c3d1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15	a4b3c2d4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16	a4b4c1d3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Для підтвердження значущості чинника використовували порівняння розрахункового критерію Фішера з табличним значення для встановленого рівня достовірності ( $\alpha=0,05$ ).

Було показано, що розраховані показники критерію Фішера є варіативними і залежать від індикаторних штамів.

Для створення оптимізованого середовища, яке буде сприяти підвищенню антагоністичної активності штаму *Mut7* проти *K. rhizophila* DSM 348, важливими виявились усі чинники, крім дріжджового екстракту (табл. 8).

Для створення середовища, яке сприяє підвищенню антагоністичної активності штаму *Mut7* проти *E. coli* ATCC 25922, необхідно використовувати усі чинники (табл. 8).

Навпаки, органічні складові живильних середовищ майже не впливали на зміну рівня антагоністичної активності штаму *Mut7* проти *B. subtilis* ATCC 6633 та *S. enterica* NCTC 6017 (табл. 8).

Для підвищення рівня антагоністичної активності штаму *Mut7* проти *P. putida* КТ 2440 необхідним чинником виявилась меляса, а для підвищення рівня антагоністичної активності штаму *Mut7* проти *C. albicans* ATCC 18804 до складу живильного середовища повинен входити екстракт солоду (табл. 8).

Таблиця 8

**Показники критерію Фішера для кожного чинника при оптимізації середовища «Промислове 1»**

Чинник	Критерій Фішера ( $F_{st} = 3,49$ при $f_1=3, f_2=12$ )					
	<i>K. rhizophila</i> DSM 348	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	<i>S. enterica</i> NCTC 6017	<i>P. putida</i> КТ 2440
А (Кукурудзяний екстракт)	28.7	14.3	2.85	0.89	0.86	2.91
В (Екстракт солоду)	27.7	9.03	1.93	3.95	1.65	0.8

Продовження табл. 8

С (Меляса)	12.4	11.06	0.59	0.75	0.67	4.34
D (Дріжджовий екстракт)	1.69	4.01	0.91	0.97	0.94	2.75

Розраховані оптимальні концентрації, відповідно до показників ефекту впливу чинника, наведені у таблиці 9.

Таблиця 9

**Оптимальні комбінації чинників, отримані на підставі розрахунку ефекту впливу**

Тест -штам	Оптимальна комбінація чинників		Концентрації чинників
	Теоретичні розрахунки	Практичні результати	
<i>K. rhizophila</i> DSM 348	a2b1c2d4	a2b1c2d3	Кукурудзяний екстракт – 20 г/л Екстракт солоду – 15 г/л Меляса – 19 г/л Дріжджовий екстракт – 5 г/л
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	a3b1c3d4	a3b1c3d4 a2b2c1d4	Кукурудзяний екстракт – 15 г/л Екстракт солоду – 20 г/л Меляса – 26 г/л Дріжджовий екстракт – 0 г/л
<i>P. putida</i> KT 2440	a2b2c3d4	a2b4c3d2	Кукурудзяний екстракт – 20 г/л Екстракт солоду – 15 г/л Меляса – 12 г/л Дріжджовий екстракт – 0 г/л
<i>E. coli</i> ATCC 25922	a3b2c3d3	a2b1c2d3	Кукурудзяний екстракт – 15 г/л Екстракт солоду – 15 г/л Меляса – 12 г/л Дріжджовий екстракт – 5 г/л
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	a3b1c1d4	a3b1c3d4	Кукурудзяний екстракт – 15 г/л Екстракт солоду – 20 г/л Меляса – 26 г/л Дріжджовий екстракт – 0 г/л
<i>S. enterica</i> NCTC 6017	a3b1c3d4	a3b1c3d4	Кукурудзяний екстракт – 15 г/л Екстракт солоду – 20 г/л Меляса – 12 г/л Дріжджовий екстракт – 0 г/л

Ґрунтуючись на отриманих даних, ми пропонуємо декілька складів поживних середовищ для культивування штаму Mut7 з метою підвищення

його антимікробної активності з диференційованим внесенням  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  – 1,5 г/л,  $\text{KNO}_3$  – 7 г/л,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 5,0 г/л,  $\text{MgSO}_4$  – 0,5 г/л.

Середовище 1.7      Кукурудзяний екстракт – 15 г/л  
 Екстракт солоду – 15 г/л  
 Меляса – 19 г/л  
 Дріжджовий екстракт – 10 г/л  
 $\text{KNO}_3$  – 7,0 г/л  
 $\text{MgSO}_4$  – 0,5 г/л.

Середовище 2.7      Кукурудзяний екстракт – 15 г/л  
 Екстракт солоду – 15 г/л  
 Меляса – 12 г/л  
 $\text{KNO}_3$  – 7,0 г/л  
 $\text{MgSO}_4$  – 0,5 г/л.

Середовище 3.7      Кукурудзяний екстракт – 15 г/л  
 Екстракт солоду – 15 г/л  
 Меляса – 12 г/л  
 $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  – 1,5 г/л  
 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 5,0 г/л  
 $\text{MgSO}_4$  – 0,5 г/л.

Таблиця 10

**Антагоністична активність штаму Mut7 в кожному досліді (комбінація чинників відповідає матриці планування) по відношенню до штамів індикаторів при оптимізації складу середовища Гаузе 2**

№ досліду	Комбінація чинників	Зона лізису, мм					
		<i>K. rhizophila</i> DSM 348	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	<i>S. enterica</i> NCTC 6017	<i>P. putida</i> KT 2440
1	A1b1c1	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	A1b2c2	0,0	2,0	1,7	0,0	0,0	1,0
3	A1b3c3	0,0	3,0	1,0	3,7	0,0	0,0
4	A2b1c2	4,0	0,0	0,0	1,5	0,0	1,5

## Продовження табл. 10

5	A2b2c3	5,5	0,0	1,0	0,7	0,0	0,0
6	A2b3c1	4,5	2,0	0,0	1,0	0,0	2,5
7	A3b1c3	0,0	0,0	2,0	1,3	0,0	0,0
8	A3b2c1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9	A3b3c2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5

Для даного етапу оптимізації було показано, що для створення оптимізованого середовища, яке буде сприяти підвищенню антагоністичної активності штаму *Mut7* проти *K. rhizophila* DSM 348, важливими є присутність пептону (табл. 11).

Для створення середовища, яке сприяє підвищенню антагоністичної активності штаму *Mut7* проти *E. coli* ATCC 25922, необхідно використовувати глюкозу та пептон (табл. 11).

Для створення середовища, яке сприяє підвищенню антагоністичної активності штаму *Mut7* проти *B. subtilis* ATCC 6633 та *C. albicans* ATCC 18804, необхідно включити до складу дріжджовий екстракт (табл. 11).

Для підвищення рівня антагоністичної активності штаму *Mut7* проти *P. putida* КТ 2440 необхідним є усі чинники (табл. 11).

Антагоністичної активності по відношенню до *S. enterica* NCTC 6017 у цій серії дослідів не було зафіксовано (табл. 11).

Таблиця 11

**Показники критерію Фішера для кожного чинника при оптимізації середовища Гаузе 2**

Чинник	Критерій Фішера ( $F_{st} = 2,93$ при $f_1=2, f_2=7$ )					
	<i>K. rhizophila</i> DSM 348	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	<i>S. enterica</i> NCTC 6017	<i>P. putida</i> КТ 2440
А (Глюкоза)	0,7	2,93	0,36	1,53	0,0	9,5
В (пептон)	11,24	2,93	0,6	0,61	0,0	4,5
С (Дріжджовий екстракт)	1,13	0,15	3,31	2,56	0,0	12,5

Розраховані оптимальні концентрації, відповідно до показників ефекту впливу чинника, наведені у таблиці 12.

Таблиця 12

**Оптимальні комбінації чинників, отримані на підставі розрахунку ефекту впливу**

Тест -штам	Оптимальна комбінація чинників		Концентрації чинників
	Теоретичні розрахунки	Практичні результати	
<i>K. rhizophila</i> DSM 348	a1b1c3	a2b2c3	Глюкоза –21 г/л Пептон – 11 г/л Дріжджовий екстракт – 4 г/л
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	a3b1c3	a3b1c3	Глюкоза –14 г/л Пептон – 11 г/л Дріжджовий екстракт – 4 г/л
<i>P. putida</i> KT 2440	a2b2c1	a3b2c1 a3b3c1	Глюкоза –21 г/л Пептон – 6 г/л Дріжджовий екстракт – 8 г/л
<i>E. coli</i> ATCC 25922	a3b1c3	a3b1c3	Глюкоза –14 г/л Пептон – 11 г/л Дріжджовий екстракт – 4 г/л
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	a2b1c3	a1b3c3	Глюкоза –21 г/л Пептон – 6 г/л Дріжджовий екстракт – 4 г/л

Грунтуючись на отриманих даних, ми пропонуємо декілька складів поживних середовищ для культивування штаму Mut7 з метою підвищення його антимікробної активності з внесенням  $KNO_3$  – 5 г/л,  $K_2HPO_4$  – 0,5 г/л,  $MgSO_4$  – 1 г/л.

Середовище 4.5

Глюкоза –21 г/л

Пептон – 6 г/л

Дріжджовий екстракт – 8 г/л

$KNO_3$  – 2 г/л

$K_2HPO_4$  – 0,5 г/л

$MgSO_4$  – 1 г/л.

Середовище 5.5	Глюкоза – 28 г/л
	Пептон – 8,5 г/л
	Дріжджовий екстракт – 4 г/л
	KNO <sub>3</sub> – 2 г/л
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,5 г/л
	MgSO <sub>4</sub> – 1 г/л.

Отримані середовища використані для подальшого аналізу

### 3.3. Характеристика антимікробних речовин дослідженого штаму за результатами біоінформатичного пошуку

Для дослідження були обрані тест-штами умовно-патогенних мікроорганізмів з наступними характеристиками:

1) *Candida albicans*: грибок, зазвичай зустрічається в ротовій порожнині та кишечнику здорових людей, може викликати кандидоз, особливо у людей з ослабленою імунною системою.

2) *Escherichia coli*: грамнегативна паличкоподібна бактерія, зазвичай знаходиться в нижній частині кишечника теплокровних організмів, деякі штами можуть бути патогенними та викликати харчові отруєння.

3) *Kocuria rhizophila*: грампозитивна бактерія, живе в ґрунті та використовується в промисловості для антимікробних тестів та у харчовій промисловості.

4) *Bacillus subtilis*: грампозитивна паличкоподібна бактерія, зазвичай знаходиться в ґрунті, але також може бути вирощена в лабораторії, відома своєю здатністю виробляти теплостійкі спори.

5) *Pseudomonas putida*: грамнегативна паличкоподібна бактерія, часто виділяється з різних екологічних та клінічних зразків, має різноманітний метаболізм і використовується у дослідженнях та синтезі хімічних речовин.

Знаючи характеристики тест-штамів умовно-патогенних мікроорганізмів, виходячи з результатів посівів (табл. б) та аналізу кластерів генів, що кодують

вторинні метаболіти в геномі *Streptomyces ambofaciens* Myt7, за допомогою сервера antiSMASH (табл. 13), можна припустити, що досліджуваний штам актинобактерій синтезує наступні антимікробні речовини:

- 1) *Альбафлавенон*, який у чистому вигляді активний щодо *Bacillus subtilis*.
- 2) *Спірамицін*, активний щодо *E. coli* та *B. subtilis*.
- 3) *Геосмін*, активний щодо *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, а також грибів *C. albicans*. Має широкий спектр дії і може бути ефективним проти *P. putida* та *K. rhizophila*.

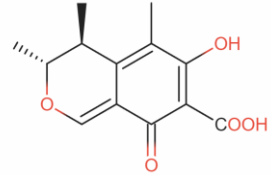
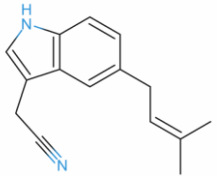
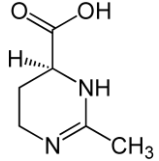
Оптимізація виробництва *альбафлавенону* з актинобактерій включає кілька факторів, які можуть впливати на вихід та ефективність процесу. Ось деякі ключові моменти, засновані на сучасних знаннях:

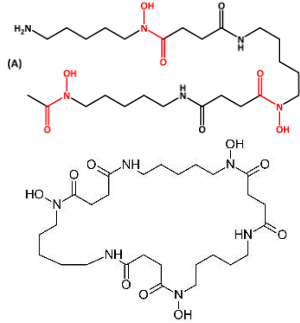
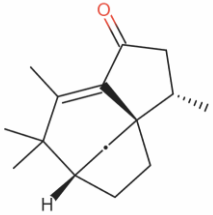
- **Склад середовища:** Компоненти середовища, в якому культивуються актинобактерії, можуть суттєво впливати на виробництво альбафлавенону. Встановлено, що такі інгредієнти, як сахароза, розчинний крохмаль, соєве борошно і різні солі впливають на вихід.

- **Умови ферментації:** Такі фактори, як концентрація мікроорганізмів, склад середовища, швидкість обертання, час ферментації, температура і початковий рівень рН мають вирішальне значення для оптимізації процесу ферментації. Наприклад, об'єм посіву 5%, об'єм середовища 75 мл у колбі 250 мл, швидкість обертання 180 об/хв, час ферментації 4 дні, температура 28°C і початковий рівень рН 7,0. За таких умов швидкість інгібування була збільшена на 6,71% [Qin Song et al., 2012].

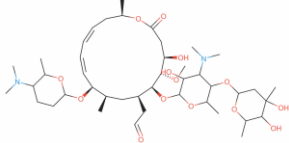
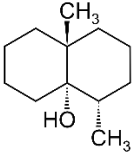
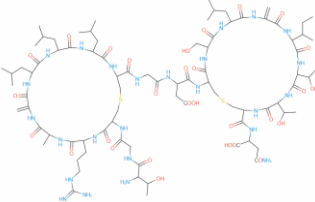
- **Потреба в кисні:** Більшість актинобактерій потребують підвищеного рівня кисню для росту та оптимального продукування метаболітів. Забезпечення адекватної оксигенації під час процесу ферментації є надзвичайно важливим.

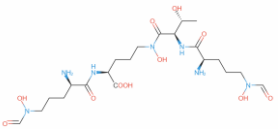
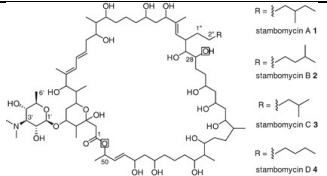
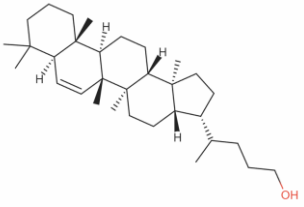
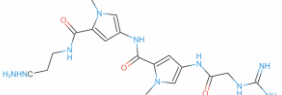
Спектр активності вторинних метаболітів *Streptomyces ambofaciens* Myt7

Продуцент	Назва антимікробної сполуки	Клас сполуки	Формула	*,%	Спектр активності
<i>Streptomyces ambofaciens</i> Myt7	Антиміцин	Полікетиди (макроліди)		100	Комплекс антиміцину А - це бактеріальний метаболітний комплекс, який складається з основних компонентів антиміцину А <sub>1</sub> , А <sub>2</sub> , А <sub>3</sub> та А <sub>4</sub> , а також другорядні компоненти антиміцин А <sub>5</sub> та А <sub>6</sub> . Він індукує синтез каротиноїдів у <i>M. marinum</i> при використанні в концентраціях від 3,3 до 160 мкМ.
	5-диметилаліліндол-3-ацетонітрил	Індоли		100	Цитотоксична та протигрибкова активність. Також може мати ще невідому біологічну активність.
	Ектоїн	Осмопротектори		100	За допомогою ектоїну бактерії захищаються від екстремальних умов навколишнього середовища, наприклад, від сильних температурних коливань, високої концентрації солей, висихання та УФ-проміння. Завдяки цьому екстремофільні організми можуть виживати в стресових умовах.

	<p>Дефероксамін В Дефероксамін Е</p>	<p>Сидерофори</p>		<p>100</p>	<p>Антибіотики. Антимікобактеріальні. Призначені лише для дослідницького використання та не для терапевтичного чи діагностичного використання. Інhibують утворення біоплівки <i>M. smegmatis</i> і <i>M. bovis</i>, ефект, який може бути скасований залізом. Цитотоксичні для ракових клітин T47D, SK-MEL-5, SK-MEL-28 і RPMI-7951. Дефероксамін Е також індукує морфологічні зміни в клітинах комах VM-N4.</p>
	<p>Альбафлавенон</p>	<p>Терпени</p>		<p>100</p>	<p>Чистий альбафлавенон активний проти <i>Bacillus subtilis</i>. У аналізі серійного розведення найнижча концентрація для пригнічення росту <i>Bacillus subtilis</i> для альбафлавенону було визначено як 8-10 мкг/мл. Тривають подальші дослідження антимікробної активності.</p>

Продовження табл. 13

	Спіраміцин	Полікетиди (макроліди)		100	<p>Пригнічує зв'язування тетрагідролейкоміцину А<sub>3</sub> до рибосом <i>E. coli</i> і активний відносно <i>S. aureus</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>B. cereus</i> і <i>M. Luteus</i>. Спіраміцин захищає мишей від інфекцій, спричинених <i>S. aureus</i>, <i>S. pneumoniae</i> та <i>P. Berghei</i>. Продукт є сумішшю спіраміцину I, II і III, основним компонентом якого є спіраміцин I.</p>
	Геосмін	Терпени		100	<p>Активний проти <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Mycobacterium vaccae</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>, vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Escherichia coli</i>, а також грибів <i>Sporobolomyces salmonicolor</i>, <i>Candida albicans</i>, <i>Penicillium notatum</i>.</p>
	SapB	Лантипептиди		100	<p>Функціонує як біосурфактант для сприяння росту повітряних гіф</p>

	Coelichelin	Нерибосомальні пептиди		100	Допомагає адаптуватися до умов обмеженого харчування
	Стамбоміцин А Стамбоміцин В Стамбоміцин С Стамбоміцин D	Полікетиди (макроліди) Сахариди		100	Мають перспективну антипроліферативну активність проти клітин раку людини.
	Норене	Терпени		92	Не є антимікробним засобом і не має антимікробного спектру дії. Він є одним з багатьох терпеноїдів, які зустрічаються в природі. У бактерій може входити до складу клітинних мембран.
	Нетропсин	Нерибосомальні пептиди		86	Нетропсин інгібує топоізомеразу II та теніпозид-індуковані поперечні зв'язки в ядрах клітин фібросаркоми мишей. Активний проти кількох бактерій, включаючи <i>S. aureus</i> , <i>S. typhosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> та <i>A. Aerogenes</i> . 75 мкг/мл пригнічує утворення вірусних бляшок у клітинах хазяїна, інфікованих вірусом фіброми Шоупа або вірусом коров'ячої віспи.

Примітка: \* – відсоток генів у найближчому відомому поєднанні, які мають значний збіг BLAST з генами у поточному регіоні, схожість BGC – «кластер біосинтетичних генів».

Оптимізація виробництва *спіраміцину* з актинобактерій передбачає багатогранний підхід. Кілька стратегій, заснованих на останніх досягненнях, включають в себе оптимізацію:

- Джерел вуглецю: найпоширенішими джерелами вуглецю є глюкоза, сахароза, мальтоза і гліцерин.

- Джерел азоту: такі як соєве борошно, дріжджовий екстракт, пептон та амонійні солі.

- Фосфор і мікроелементи: рівень фосфору та мікроелементів (наприклад, магнію, заліза, цинку) в середовищі для підтримки росту мікроорганізмів та біосинтезу спіраміцину.

- рН: актинобактерії часто мають специфічні вимоги до рН для оптимального росту і виробництва вторинних метаболітів, тому використовують буферні речовини для підтримання стабільного рівня рН протягом усього процесу ферментації.

- Солі та буферні агенти: відрегульована концентрація солей (наприклад, NaCl) і буферних агентів, для створення середовища, сприятливого для росту актинобактерій і виробництва спіраміцину.

- Постачання кисню: актинобактерії є аеробними мікроорганізмами, і наявність кисню має вирішальне значення для їх росту і виробництва метаболітів.

- Контроль температури: актинобактерії можуть мати специфічні температурні вимоги, і підтримка оптимальної температури є важливою для максимального виробництва спіраміцину.

Оптимізація поживного середовища для кращого синтезу *геосміну* актинобактеріями включає в себе:

- Джерела поживних речовин: вибір джерел вуглецю та азоту в середовищі може суттєво вплинути на синтез геосміну. Органічні сполуки, такі як глюкоза, гліцерин або солодовий екстракт, можуть слугувати джерелами вуглецю, тоді як джерела азоту можуть включати амонійні солі або дріжджовий екстракт.

- Мікроелементи: присутність мікроелементів, таких як магній, кальцій і залізо, необхідна для росту і метаболічної активності актинобактерій. Ці елементи повинні бути включені в середовище.

- рН і температура: рН і температура середовища також є важливими факторами. Актинобактерії, що виробляють геосмін, зазвичай віддають перевагу нейтральному або злегка лужному рН і температурному діапазону 25-30°C. Вплив температури на синтез геосміну у стрептоміцетів вивчали у дослідженні [Aoyama et al., 1993], під час якого виявили, що виробництво геосміну трьома видами стрептоміцетів залежало від температури і мало нижчу оптимальну температуру, ніж ріст клітин. Дослідники спостерігали подібну температурну залежність для виробництва антибіотиків стрептоміцетами.

- Аерація: достатньої аерації можна досягти шляхом використання шейкерів або реакторів з перемішуванням.

- Збагачення середовища: Збагачення середовища певними поживними речовинами може стимулювати деградацію геосміну місцевими бактеріями, що свідчить про те, що рівень поживних речовин може впливати на динаміку геосміну. Наприклад, було показано, що збагачення середовища LB стимулює деградацію геосміну. Ефект збагачення LB свідчить про те, що найважливішим фактором у стимулюванні деградації геосміну є висока бактеріальна активність [Klausen et al., 2005].

- Сезонні коливання: важливо враховувати сезонні коливання чисельності та метаболічної активності актинобактерій, оскільки вони можуть впливати на виробництво геосміну. Сезонне коригування складу середовища може допомогти підтримувати стабільні темпи видобутку.

Проаналізувавши компоненти, які стимулюють синтез антимікробних сполук у актинобактерій, можна зазначити, що:

- *Кукурудзяний екстракт та екстракт солоду*: Ці компоненти є джерелами вуглеводів та білків, які можуть сприяти росту актинобактерій і,

відповідно, продукуванню метаболітів. Вони присутні у більшості досліджуваних середовищ з антимікробною активністю.

- *Меляса*: Цей компонент містить велику кількість цукрів, що також може бути корисним для біосинтезу метаболітів. Присутній у середовищах Промислове 1, Середовище 1.7, Середовище 2.7, та Середовище 3.7, які показали антимікробну активність.

- *Дріжджовий екстракт та пептон*: Забезпечують необхідні амінокислоти та пептиди для синтезу білків. Вони присутні у багатьох досліджуваних середовищах з антимікробною активністю.

- $KNO_3$ : Може використовуватися як джерело азоту для мікроорганізмів. Присутній у більшості досліджуваних середовищ з антимікробною активністю.

- $MgSO_4$ : Важливий для функціонування багатьох ферментів. Присутній у багатьох досліджуваних середовищах з антимікробною активністю.

- $K_2HPO_4$ : Використовується як буфер і джерело фосфору. Присутній у середовищах Промислове 2, Середовище 3.7, та Середовище 6613, які показали антимікробну активність.

На основі цих спостережень можна припустити, що вищезазначені компоненти можуть сприяти синтезу антимікробних сполук, таких як альбафлавенон, спіраміцин та геосмін. Однак, для точного визначення, які саме компоненти найбільше впливають на продукування цих метаболітів, потрібно провести додаткові експериментальні дослідження. Також важливо враховувати можливість синергічної взаємодії між різними компонентами.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

Природні сполуки мікробного походження відіграють ключову роль у розробленні ліків, особливо коли мова йде про боротьбу з інфекціями. В останні десятиліття інфекційні захворювання, спричинені мікроорганізмами, набули значного поширення, головним чином через виникнення MDR патогенів, стійких до дії більшості препаратів, що застосовують сьогодні у клініці. Розроблення нових лікарських препаратів в багатьох випадках ґрунтується на застосуванні природних біологічно активних сполук, виділених з мікроорганізмів. Це зумовлює великий інтерес до вивчення мікробного різноманіття природних біотопів з метою скринінгу нових природних сполук. Значну увагу приділяють дослідженню одного з найбільших класів мікроорганізмів – *Actinomycetia*. Представники цього класу є чи не найбільшим джерелом природних антибіотиків [De Simeis et al., 2021].

У ході дослідження був використаний штам *Streptomyces ambofaciens* Mut7 з музею культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, виділений співробітником кафедри к.б.н. Коротаєвою Надією Володимирівною з поверхні мушлі мідій, ізольованих з Чорного моря.

Морські актинобактерії мають здатність синтезувати вторинні метаболіти, такі як антибіотики та імуносупресори, які застосовуються в медицині та ветеринарії. Морське середовище відрізняється від ґрунтового, тому морські актинобактерії розвивають спеціальні характеристики та адаптації до особливих умов морського середовища. Це сприяє тому, що морські актинобактерії можуть створювати нові типи вторинних метаболітів, які відмінні від ґрунтових актинобактерій. Тому морські мікроорганізми вважаються перспективним джерелом нових біоактивних метаболітів, таких як макроліди, циклічні пептиди, полікетиди, терпени, алкалоїди та стероїдні алкалоїди [Потапенко та ін., 2021].

У результаті дослідження було проведено оптимізацію складу поживних

середовищ для культивування *Streptomyces ambofaciens* Myt7, як базові використали середовища «Промислове 1» та Гаузе 2, як план експерименту використовувався греко-латинський квадрат з чотирма чинниками на чотирьох рівнях варіювання, де кожен з рівнів чинників з'являється тільки один раз в кожному рядку і в кожному стовпці, і тільки один раз вони поєднуються в парі між собою для середовища «Промислове 1», та греко-латинський квадрат з трьома чинниками на трьох рівнях варіювання для середовища Гаузе 2.

Вибір ґрунтувався на тому, що греко-латинські квадрати дозволяють виявити найбільш ефективні поєднання чинників без урахування взаємодій між чинниками і мінімізувати кількість розрахунків та лабораторних маніпуляцій.

Оптимізацію живильних середовищ проводили за допомогою дисперсійного аналізу за класичною методикою, адаптованого за планом на греко-латинських квадратах [Васильєва, Ямборко, 2022]. Як показник оптимізації використовували діаметр зон лізису (мм).

Для визначення антагоністичної активності штаму Myt7 за умов його культивування у різних живильних середовищах використовували штами-індикатори з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kucoria rhizophila* DSM 348 та *Candida albicans* ATCC 18804. Визначення антагоністичної активності здійснювали на середовищі LB (0,7 %) методом лунок.

Для аналізу кластерів генів, що кодують вторинні метаболіти, в геномі *Streptomyces ambofaciens* Myt7 використовувався сервер antiSMASH. Було припущено, що досліджуваний штам актинобактерій синтезує альбафлавенон, який у чистому вигляді активний щодо *Bacillus subtilis*, спіраміцин, який активний щодо *E. coli* та *B. subtilis* та геосмін, який активний щодо *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *C. Albicans*, а також проти *P. putida* та *K. rhizophila*.

## ВИСНОВКИ

1. Середовище Промислове 2 є найоптимальнішим для отримання антимікробних метаболітів досліджуваного штаму: спостерігаються максимальні зони затримки росту *Kocuria rhizophila* DSM 348  $13\pm 0,8$  мм та *C. albicans* ATCC 18804  $12\pm 1,0$  мм. Культивування на середовищі 2.7 є найоптимальнішим для отримання антимікробних метаболітів, які ефективні щодо *E. coli* ATCC 25922 та *Bacillus subtilis* ATCC 6633: спостерігаються максимальні зони затримки росту по  $12\pm 0,7$  мм.

2. Найбільша зона затримки росту *Candida albicans* ATCC 18804 спостерігалася після росту *Streptomyces ambofaciens* Myt7 на середовищі Промислове 2 і складала  $12\pm 1,0$  мм; найбільша зона затримки росту *E. coli* ATCC 25922 – після культивування на середовищі Промислове 1 ( $13\pm 0,7$  мм); *Kocuria rhizophila* DSM 348 – після росту на середовищі 4.5 та Промислове 2 ( $13\pm 1,4$  мм та  $13\pm 0,8$  мм відповідно); *Bacillus subtilis* ATCC 6633 – після росту на середовищі 2.7 ( $12\pm 0,4$  мм); *Pseudomonas putida* ATCC 27853 – після росту на середовищі 5.5 ( $13\pm 0,8$  мм).

3. За даними antiSMASH з'ясували, що досліджуваний штам актинобактерій синтезує альбафлавенон, який у чистому вигляді активний щодо *Bacillus subtilis*, спіраміцин, який активний щодо *E. coli* та *Bacillus subtilis* та геосмін, який активний щодо *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, а також проти *Pseudomonas putida* та *Kocuria. rhizophila*, що підтверджується результатами експерименту.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Васильєва Н., Ямборко Г. Опірний конспект лекцій з дисципліни «Організація біотехнологічних процесів: оптимізація та менеджмент» для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Наталія Васильєва, Ганна Ямборко – Одеса, ОНУ, 2022.– 147 с.
2. Зедгінідзе І. Планування експерименту для дослідження багатокомпонентних систем - М. : Наука, 1976 . - 390 с.
3. Потапенко К.С., Коротаєва Н.В., Іваниця В.О. Вторинні метаболіти морських актинобактерій з антибіотичною активністю ISSN 2076–0558. Мікробіологія і біотехнологія. 2021. No 3. С 28–43. 2021 р. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3\(53\).245323](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2021.3(53).245323)
4. Aallam, Y., Dhiba, D., El Rasafi, T., Lemriss, S., Haddioui, A., Tarkka, M., & Hamdali, H. (2022). Growth promotion and protection against root rot of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by two rock phosphate and potassium solubilizing *Streptomyces* spp. under greenhouse conditions. *Plant and Soil*, 472, 407–420. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05252-w>
5. Allali, K., Goudjal, Y., Zamoum, M., Bouznada, K., Sabaou, N., & Zitouni A. (2019). *Nocardiosis dassonvillei* strain MB22 from the Algerian Sahara promotes wheat seedlings growth and potentially controls the common root rot pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Journal of Plant Pathology*, 101, 1115–1125. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00347-x>
6. Aoyama K. Tomita B. Chaya K. (1993) Influence of incubation-temperature on production of earthy-musty odor substances by actinomycetes. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*39, 207–212.
7. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria [published correction appears in *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016 Nov 9;80(4):iii]. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015;80(1):1-43. Published 2015 Nov 25. DOI = {10.1128/MMBR.00019-15}.

8. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2015). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
9. Behie, S. W., Bonet, B., Zacharia, V. M., McClung, D. J., & Traxler, M. F. (2017). Molecules to ecosystems: Actinomycete natural products in situ. *Frontiers in microbiology*, 7, 2149. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02149>
10. Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial pathogenesis*, 111, 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.036>
11. Blunt, J. W., Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., & Prinsep, M. R. (2018). Marine natural products. *Natural product reports*, 35(1), 8–53. <https://doi.org/10.1039/c7np00052a>
12. Boukhatem, Z.F., Merabet, C., & Tsaki, H. (2022). Plant growth promoting Actinobacteria, the most promising candidates as bioinoculants? *Frontiers in Agronomy*, 4:849911. <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.849911>
13. Carretero-Molina, D., Ortiz-López, F. J., Martín, J., Oves-Costales, D., Díaz, C., de la Cruz, M., Cautain, B., Vicente, F., Genilloud, O., & Reyes, F. (2019). New napyradiomycin analogues from *Streptomyces* sp. strain CA-271078. *Marine drugs*, 18(1), 22. <https://doi.org/10.3390/md18010022>
14. Cecilie Klausen, Mette H. Nicolaisen, Bjarne W. Strobel, Falk Warnecke, Jeppe L. Nielsen, Niels O.G. Jørgensen. Abundance of actinobacteria and production of geosmin and 2-methylisoborneol in Danish streams and fish ponds: *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 52, Issue 2, April 2005, Pages 265–278, <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.11.015>
15. Claessen, D., Rozen, D. E., Kuipers, O. P., Søgaard-Andersen, L., & van Wezel, G. P. (2014). Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nature reviews. Microbiology*, 12(2), 115–124. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3178>

16. Clardy, J., Fischbach, M. A., & Currie, C. R. (2009). The natural history of antibiotics. *Current biology* : CB, 19(11), R437–R441. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.001>
17. Cross, T., & Goodfellow, M. (1973). Taxonomy and classification of the actinomycetes. Society for Applied Bacteriology symposium series, 2, 11–112.
18. De Simeis, D., & Serra, S. (2021). Actinomycetes: A never-ending source of bioactive compounds - An overview on antibiotics production. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 10(5), 483. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050483>
19. Devanshi, S., R. Shah, K., Arora, S., & Saxena, S. (2022). Actinomycetes as An Environmental Scrubber. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99187>
20. Dhakal, D., Pokhrel, A. R., Shrestha, B., & Sohng, J. K. (2017). Marine rare Actinobacteria: Isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. *Frontiers in microbiology*, 8, 1106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01106>
21. Dietz, A., & Mathews, J. (1971). Classification of Streptomyces spore surfaces into five groups. *Applied microbiology*, 21(3), 527–533. <https://doi.org/10.1128/am.21.3.527-533.1971>
22. Doroghazi, J.R., Metcalf, W.W. Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes // BMC Genomics. 2013.№14, p.611. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-611>
23. Edwards, C. (1993). Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42, 161–179. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02788050>
24. El-Gendy M. M. A., Hawas U. W., Jaspars M. (2008). Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000. *J. Antibiot.* 61, 379–86. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.53>
25. Elliot, M.A., Buttner, M.J., Nodwell, J.R. ( 2008). Multicellular development in *Streptomyces*, 419–438. In Whitworth, D.E. (ed), (2007). *Myxobacteria: multicellularity and differentiation*. ASM Press, Washington, DC, 520. <https://doi.org/10.1128/9781555815677.ch24>

26. Flärdh, K., & Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature reviews. Microbiology*, 7(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1968>
27. Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983) Ecology of actinomycetes. *Annual review of microbiology*, 37, 189- 216 <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>
28. Hamed, J., Poorinmohammad, N., & Papiran, R. (2017). Growth and life cycle of Actinobacteria. In: Wink, J., Mohammadipanah, F., Hamed, J. (eds) *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1_3)
29. Hernández-Montiel, L.G., Rivas-García, T., Romero-Bastidas, M., Chiquito Contreras, C.J., Ruiz-Espinoza, F.H., & Chiquito-Contreras, R.G. (2018). Antagonistic potential of bacteria and marine yeasts for the control of phytopathogenic fungi. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9, 4311–4321. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.1000>
30. Jakab, E., Zbinden, R., Gubler, J., Ruef, C., von Graevenitz, A., & Krause, M. (1996). Severe infections caused by *Propionibacterium acnes*: an underestimated pathogen in late postoperative infections. *The Yale journal of biology and medicine*, 69(6), 477–482.
31. Kim, S. B., Lonsdale, J., Seong, C. N., & Goodfellow, M. (2003). *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae (Waksman and Henrici (1943)AL) emend. Rainey et al. 1997. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83(2), 107–116. <https://doi.org/10.1023/a:1023397724023>
32. Kucho, K., Hay, A. E., & Normand, P. (2010). The determinants of the actinorhizal symbiosis. *Microbes and environments*, 25(4), 241–252. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me10143>
33. Loria, R., Kers, J., & Joshi, M. (2006). Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annual review of phytopathology*, 44, 469–487. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.032905.091147>

34. Ludwig W. Road map of the phylum Actinobacteria/ W. Ludwig, J. Euzéby, P. Schumann, H. Busse, M.E. Trujillo, P. Kämpfer, W.B. Whitman // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. – 2012. – Vol. 5. – P. 1 – 28.
35. Luo, M., Tang, L., Dong, Y., Huang, H., Deng, Z., & Sun, Y. (2021). Antibacterial natural products lobophorin L and M from the marine-derived *Streptomyces* sp. 4506. *Natural product research*, 35(24), 5581–5587. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1797730>
36. Macagnan, D., Romeiro, R.S., Souza J.T., & Pomella, A. (2006). Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica*, 34, 122–132. <https://doi.org/10.1007/BF02981312>
37. Myo, E. M., Ge, B., Ma, J., Cui, H., Liu, B., Shi, L., Jiang, M., & Zhang, K. (2019). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. *BMC microbiology*, 19(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1528-1>
38. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*, 83(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
39. Pridham T.G, Hesseltine C.W, Benedikt R.G. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Applied Microbiology*. 1958;6(1):52–79. DOI = {10.1128/am.6.1.52-79.1958}.
40. Qin Song, Yun Huang, Hui Yang. Optimization of Fermentation Conditions for Antibiotic Production by Actinomycetes YJ1 Strain against *Sclerotinia sclerotiorum*: *Journal of Agricultural Science*; Vol. 4, No. 7; 2012. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v4n7p95>
41. Selim M.S.M., Abdelhamid S.A., Mohamed S.S. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021. p.72. DOI={10.1186/s43141-021-00156-9}. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>.

42. Sellstedt, A., & Richau, K. H. (2013). Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic Frankia. *FEMS microbiology letters*, 342(2), 179–186. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12116>
43. Sivalingam, P., Hong, K., Pote, J., & Prabakar, K. (2019). Extreme Environment Streptomyces: Potential Sources for New Antibacterial and Anticancer Drug Leads?. *International journal of microbiology*, 2019, 5283948. <https://doi.org/10.1155/2019/5283948>
44. Socha Aaron M., Garcia Dioscaris, Sheffer Roberta and Rowley David C.. Antibiotic Bisanthraquinones Produced by a *Streptomyces* Isolated from a Cyanobacterium Associated with *Ecteinascidia turbinata*: *Journal of Natural Products*, 2006, Vol. 69, No. 7. <http://surl.li/odzax>
45. Solans, M., Messuti, M. I., Reiner, G., Boenel, M., Vobis, G., Wall, L. G., & Scervino, J. M. (2019). Exploring the response of Actinobacteria to the presence of phosphorus salts sources: Metabolic and co-metabolic processes. *Journal of basic microbiology*, 59(5), 487–495. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800508>
46. Srinivasan, M.C., Laxman, R.S. & Deshpande, M.V. (1991). Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7, 171–184. <https://doi.org/10.1007/BF00328987>
47. Stackebrandt, E., Schumann, P. (2006). Introduction to the taxonomy of Actinobacteria. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. In Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, Whitman WB (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5. Springer-Verlag, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5\\_16](https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_16)
48. Strieker M., Tanovic A., Marahiel M.A. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr Opin Struct Biol* 2010 Apr; 20 (2): 234-240.
49. Takahashi Y., Nakashima T. Actinomycetes, an Inexhaustible Source of Naturally Occurring Antibiotics. *Antibiotics*. 2018; 7(45):1-17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020045>

50. Timmermans M.L., Paudel Y.P., Ross A.C. Investigating the biosynthesis of natural products from marine proteobacteria: A survey of molecules and strategies. *Mar Drugs* 2017; 15 (8).

51. Torres-Rodríguez, J. A., Reyes-Pérez, J. J., Quiñones-Aguilar, E. E., & Hernández-Montiel, L. G. (2022). Actinomycete potential as biocontrol agent of phytopathogenic fungi: Mechanisms, source, and applications. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(23), 3201. <https://doi.org/10.3390/plants11233201>

52. Trujillo, M. E., Alonso-Vega, P., Rodríguez, R., Carro, L., Cerda, E., Alonso, P., & Martínez-Molina, E. (2010). The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *The ISME journal*, 4(10), 1265–1281. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.55>

53. Ventola C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 40(4), 277–283.

54. Xu, D., Nepal, K. K., Chen, J., Harmody, D., Zhu, H., McCarthy, P. J., Wright, A. E., & Wang, G. (2018). Nocardiosistins A-C: New angucyclines with anti-MRSA activity isolated from a marine sponge-derived *Nocardiosis* sp. HB J378. *Synthetic and systems biotechnology*, 3(4), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.10.008>

55. Yang, T., Yamada, K., Zhou, T., Harunari, E., Igarashi, Y., Terahara, T., Kobayashi, T., & Imada, C. (2019). Akazamicin, a cytotoxic aromatic polyketide from marine-derived *Nonomuraea* sp. *The Journal of antibiotics*, 72(4), 202–209. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0139-7>

56. Zhang, Z., Zhou, T., Yang, T., Fukaya, K., Harunari, E., Saito, S., Yamada, K., Imada, C., Urabe, D., & Igarashi, Y. (2021). Nomimicins B-D, new tetronate class polyketides from a marine-derived actinomycete of the genus *Actinomadura*. *Beilstein journal of organic chemistry*, 17, 2194–2202. <https://doi.org/10.3762/bjoc.17.141>