

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ТІСТЕЧОК СТЕПАН ІВАНОВИЧ

УДК: [579.2]:[575:602]

ДИСЕРТАЦІЯ

**АКТИНОМІЦЕТИ РИЗОСФЕРИ ЯЛІВЦЮ ВИСОКОГО *JUNIPERUS
EXCELSA* М.-ВІЕВ.: ГЕНЕТИЧНЕ РІЗНОМАНІТТЯ ТА БІОСИНТЕТИЧНІ
ВЛАСТИВОСТІ**

Спеціальність 091 “Біологія”

Галузь знань 09 “Біологія”

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ С.І. Тістечок

Науковий керівник: Громико Олександр Миколайович, кандидат біологічних
наук, старший дослідник.

Львів – 2023

АНОТАЦІЯ

Тистечок С.І. Актиноміцети ризосфери ялівцю високого *Juniperus excelsa* M.-Vieb.: генетичне різноманіття та біосинтетичні властивості – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 “Біологія” (галузь знань 09 “Біологія”). Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2023.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню генетичного різноманіття природних ізолятів актиноміцетів ризосфери ялівцю високого (*Juniperus excelsa* M.-Vieb.) та їхнього потенціалу як продуцентів біологічно активних сполук, зокрема антибіотиків.

Поява і швидке поширення патогенних мікроорганізмів з множинною стійкістю до антибіотиків стали нагальною проблемою глобальної охорони здоров'я. Ця тривожна тенденція не лише створює значні виклики в усьому світі, але й загрожує звести нанівець досягнутий прогрес у боротьбі з інфекційними захворюваннями. Стрімке зростання кількості патогенів з мультирезистентністю спонукає дослідників до пошуку інноваційних стратегій вирішення окресленої проблематики. Відкриття нових природних біологічно активних сполук для розробки на їхній основі антимікробних препаратів є однією з таких стратегій.

Протягом всієї історії людство визнало мікроорганізми цінним джерелом сполук із терапевтичними властивостями. Природні сполуки мають різноманітну і складну хімічну будову, відточену еволюційними процесами, що підвищує ймовірність появи в них потужної біологічної активності. На відміну від сполук, отриманих шляхом комбінаторного біосинтезу, природні антибіотики мікробного походження демонструють винятковий потенціал у подоланні мультирезистентності.

Актиноміцети – різноманітна група грампозитивних бактерій, які широко розповсюджені в різних біотопах, особливо в ґрунтах, де відіграють важливу роль у забезпеченні кругообігу поживних речовин. Вони здатні продукувати біологічно активні вторинні метаболіти, які широко застосовують у медицині, ветеринарії та

сільському господарстві. Крім того, використання актиноміцетів, як біопрепарати покращує ріст рослин та веде до екологізації виробництва. Проте, основною цінністю актиноміцетів є їхня здатність продукувати антибіотичні сполуки. Ці бактерії відіграли вирішальну роль у розробці багатьох життєво важливих терапевтичних засобів для боротьби з інфекційними, онкологічними та іншими захворюваннями.

Однак, сьогодні темпи відкриття нових сполук із антибіотичними властивостями значно сповільнилися. Труднощі з виявленням нових антибіотиків пояснюють значним повторним відкриттям раніше описаних сполук, особливо серед актиноміцетів. Одним з підходів до вирішення цієї проблеми є дослідження нових і недостатньо вивчених середовищ існування мікроорганізмів для виявлення продуцентів нових біологічно активних сполук. В цьому аспекті, територія України є одним з таких регіонів, мікробне біорізноманіття якого практично не вивчали. Відомо, що бактеріальні угруповання ризосфери рослин вирізняються великою різноманітністю. Унікальною з точки зору рослинного, а відтак мікробного, різноманіття на території України є вузька смуга субтропіків середземноморського типу на чорноморському узбережжі Кримського півострова. В межах цієї зони росте велика кількість рідкісних та ендемічних рослин. Нечисленні попередні дослідження нашої лабораторії у співпраці із науковою групою проф. А. Лужецького (Саарландський університет, Німеччина), продемонстрували потенціал окремих ізолятів актиноміцетів ризосфери рослин Кримського півострова, як продуцентів нових біологічно активних сполук. Однією з таких рослин є *J. excelsa*, який за даними Червоної книги України віднесений до вразливих видів. Цей вид має лікарські властивості, обумовлені великою кількістю біологічно активних сполук. Відомо, що із ризосфери лікарських рослин з високою імовірністю можна виділити продуцентів антибіотиків в т.ч. нових. З огляду на це, метою даної роботи було вивчення генетичного різноманіття актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* та оцінка їхнього біосинтетичного потенціалу як потенційних продуцентів нових біологічно активних речовин. Об'єктом дослідження слугувало генетичне різноманіття та

властивості актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* на території Кримського півострова. Предмет дослідження – біосинтетичний потенціал актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* як продуцентів широкого спектру біоактивних сполук, в т.ч. нових антибіотиків.

Досліджено філогенетичне різноманіття актиноміцетів, виділених з ризосфери *J. excelsa*, в результаті якого, визначено родини та роди, до яких належать ці ізоляти. Встановлено приналежність виділених актиноміцетів до семи родин (*Kribbellaceae*, *Micrococcaceae*, *Micromonosporaceae*, *Nocardiaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Pseudonocardiaceae* та *Streptomycetaceae*) та одинадцяти родів (*Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora* та *Streptomyces*) класу *Actinomycetia*. Виявлено, що найбільша кількість ізолятів, 350 або 94% від усіх, належали до роду *Streptomyces*. Вперше з біотопів України виділено представника дуже рідкісного роду актиноміцетів *Actinorectispora*, який сьогодні налічує лише два типових види. Використання прямого висівання ґрунтових суспензій без додаткових обробок зразків дало змогу виділити найбільшу кількість ізолятів, зокрема представників шести родів актиноміцетів (*Amycolatopsis*, *Promicromonospora*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Rhodococcus* та *Streptomyces*).

Досліджено вплив складу поживних середовищ на різноманітність отриманих ізолятів. Найбільше ізолятів виділено на середовищі ISP3, проте всі вони належали до роду *Streptomyces*. Стрептоміцети виявляли на усіх використаних середовищах й кількісно вони переважали інші роди. Найбільше родове різноманіття спостерігали на середовищах ISP4 (*Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus* та *Micromonospora*) та Хітиновому (*Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Nocardia* та *Saccharopolyspora*), причому із суттєвими відмінностями спектру родів.

Здійснено аналіз антагоністичних властивостей актиноміцетів проти широкого пулу тест-культур мікроорганізмів. Показано, що значна кількість ізолятів здатна пригнічувати ріст збудників внутрішньолікарняних інфекцій (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*

pneumoniae subsp. *pneumonia*, *Proteus vulgaris* та *Candida albicans*). Окрім цього, виявили понад 60% ізолятів, які затримували ріст хоча б однієї з використаних тест-культур фітопатогенних мікроорганізмів. Серед них найбільше антагоністів було проти грамгенативних бактерій (*Xantomonas campestris* pv. *campestris*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* та *Erwinia amylovora*), які спричиняють бактеріози у широкого кола сільськогосподарських культур.

Для значної кількості досліджених природних ізолятів ризосфери *J. excelsa* властиві потенційні ріст-стимулювальні властивості, такі як здатність до асиміляції атмосферного азоту, солюбілізації нерозчинних форм Фосфору, синтез індоліл-3-оцтової кислоти та сидерофорів, які задіяні в асиміляції мікроелементів, зокрема заліза. Деякі ізоляти поєднували декілька досліджуваних властивостей та можуть бути перспективними для розробки біопрепаратів для рослинництва.

Використовуючи різні підходи здійснено скринінг біологічно активних сполук, які продукують досліджувані ізоляти. Дереплікативний аналіз екстрактів вторинних метаболітів актиноміцетних ізолятів, які мали різний спектр та рівень антимікробної дії виявлено антибіотики десертomicин А, канханаміцин А, стрепторубін В, спектинабілін, антиміцини, спіраміцини та стамбоміцини. Застосовуючи специфічні мікробні біосенсори здійснено скринінг продуцентів певних класів антибіотиків. Вперше використано штам-біосенсор *S. lividans* ТК24 рМО16, для скринінгу продуцентів тіопептидних антибіотиків серед природних ізолятів. Внаслідок чого виявлено два ізоляти, які продукували бернінаміцини А і В. Використання біосенсора *Bacillus subtilis* НВ0950 дозволило виявити 31 ізолят із потенційною здатністю до синтезу антибіотиків-інгібіторів клітинної стінки бактерій. Внаслідок хімічного аналізу екстрактів одного з цих ізолятів (*Streptomyces* sp. Je 1-6) ідентифіковано антибіотик лідикаміцин та його похідних. Використання специфічного біосенсора для скринінгу памаміцинів *S. albus* ΔpseB4 CD10RO1 дало змогу виявити 26 потенційних продуцентів цих антибіотиків.

В результаті рутинного скринінгу вторинних метаболітів досліджуваних ізолятів з широким спектром антимікробної дії відкрито два нові антибіотики

фурахіноцини L і K. Виявлені сполуки мають меротерпеноїдну структуру та подібні до групи сполук з родини фурахіноцинів. Вони у своїх структурах містять модифікації полікетид-нафтохінонового скелету, які до нині ще не були описані для фурахіноцинів. Зокрема, наявність оксиметильної групи у структурі фурахіноцину K та ацетилгідразону у фурахіноцині L. Ідентифіковано кластер генів, який ймовірно відповідає за біосинтез фурахіноцинів K та L. Виявлено, що цей кластер має значну відмінність від вже описаного кластеру генів фурахіноцину C зі штаму *Streptomyces* sp. KO-3988. Водночас, усі ключові гени, що беруть участь у формуванні ядра нафтохінону, поліпренілсинтетази та пренілтрансферази були присутні в кластері ізоляту *Streptomyces* sp. Je 1-369.

Запропоновано ймовірний шлях біосинтезу фурахіноцинів K та L на основі передбачуваних функцій генів наявних у кластері, даних біосинтезу фурахіноцину C та подібних сполук. Цілком імовірно, що приєднання ацетилгідразону під час формування структури фурахіноцину L відбувається на пізній стадії біосинтезу та за ймовірної участі гену амінотрансферази (Orf 3).

Встановлено, що фурахіноцин K виявляє цитотоксичну активність проти клітинної лінії HepG2 зі значенням IC50 12,6 мкг/мл, проте не має антимікробної дії. Водночас, для фурахіноцину L характерна антибактеріальна активність проти грампозитивних бактерій *S. aureus* Newman та *B. subtilis* зі значенням МІК 2 мкг/мл та 64 мкг/мл, відповідно, проте не характерна цитотоксична дія. Виявлений в цій роботі фурахіноцин L – перший фурахіноцин із антибактеріальною активністю. Описані сполуки можуть мати важливе значення для подальших досліджень і розробок у галузі антимікробної терапії.

Виконане дослідження вказує на великий біосинтетичний потенціал природних ізолятів актиноміцетів, виділених з ризосфери *J. excelsa*. Виявлені в ході роботи рідкісні роди актиноміцетів можуть бути щедрим джерелом нових біологічно активних речовин. Штами з широким спектром біологічних активностей, продуценти цілого спектру антибіотиків, головно нових меротерпеноїдів фурахіноцинів K і L будуть платформою для подальших досліджень їхнього біотехнологічного потенціалу. Результати роботи

розкривають перспективи подальшого дослідження мікробного біорізноманіття природних біотопів України, зокрема Кримського півострова. Створена в ході роботи колекція природних ізолятів актиноміцетів може бути платформою для розроблення нових терапевтичних препаратів медичного і ветеринарного призначення, а також біопрепаратів для сільського господарства.

Ключові слова: ґрунтові мікроорганізми; актиноміцети; вторинні метаболіти; біологічно активні речовини; антибіотики; генетичне різноманіття; метаболізм; філогенетична реконструкція; ріст-стимулювальні властивості; асиміляція: Феруму, Фосфору, Нітрогену; цикл Нітрогену; *Streptomyces*; фурахіноцини; ацетилгідразон.

SUMMARY

Tistechok S.I. Actinomycetes from the rhizosphere of Greek juniper *Juniperus excelsa* M.-Bieb.: Genetic diversity and biosynthetic properties – Qualifying scientific work on the right of the manuscript.

Thesis for a degree of Doctor of Philosophy on speciality 091 “Biology” (field of knowledge 09 “Biology”). Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2023.

This dissertation presents an investigation of the genetic diversity of natural isolates of actinomycetes from the rhizosphere of *Juniperus excelsa* M.-Bieb. and their potential as producers of biologically active compounds, including antibiotics.

The emergence and rapid dissemination of multidrug-resistant pathogens have become a pressing global health concern. This alarming trend not only presents substantial worldwide challenges but also jeopardizes the progress achieved in combatting infectious diseases. The swift distribution of multidrug-resistant pathogens has driven researchers to find innovative strategies to address this problem. The identification of new natural bioactive compounds with the potential to develop antimicrobial drugs is one such approach.

Throughout history, humanity has acknowledged microorganisms as a valuable source of compounds that possess therapeutic properties. Natural compounds exhibit diverse and intricately structured chemistry shaped by evolutionary processes, thereby enhancing the probability of their robust biological activity. In contrast to compounds synthesized via combinatorial biosynthesis, naturally occurring antibiotics of microbial origin show remarkable potential for conquering multidrug resistance.

Actinomycetes are a group of Gram-positive bacteria that are ubiquitous in various habitats, especially in soils, where they play an important role in ensuring nutrient cycling. They are capable of producing biologically active secondary metabolites that are actively used in human medicine, veterinary medicine and agriculture. In addition, the use of actinomycetes as biological products improves plant growth and leads to the greening of production. However, the main value of actinomycetes is their ability to produce antibiotic compounds. These bacteria have

played a crucial role in the development of many life-saving therapeutic agents to fight infectious, cancer and other diseases.

However, today, the pace of discovery of new compounds with antibiotic properties has slowed considerably. The difficulties in this area are explained by the significant rediscovery of previously described compounds, especially actinomycetes. One approach to solving this problem is to study new and insufficiently studied microbial habitats to identify producers of new biologically active compounds. In this respect, the territory of Ukraine, the microbial biodiversity of which has not been studied, is one of such regions. It is known that the bacterial communities of the plant rhizosphere are highly diverse. A narrow strip of Mediterranean-type subtropics on the Black Sea coast of the Crimean peninsula is unique in terms of plant, and therefore microbial, diversity in Ukraine. This zone is home to a large number of rare and endemic plants. A few preliminary studies in our laboratory, in collaboration with the research group of Prof. A. Luzhetsky (University of Saarland, Germany), have demonstrated the potential of certain isolates of rhizosphere actinomycetes from plants of the Crimean peninsula as producers of new biologically active compounds. One of these plants is *J. excelsa*, which is classified as a vulnerable species according to the Red Data Book of Ukraine. This species has medicinal properties due to its large number of different compounds with diverse properties. It is worth noting that antibiotic producers, including new ones, can be isolated from the rhizospheres of medicinal plants with a high probability. In view of this, the aims of this work was to study the genetic diversity actinomycetes in *J. excelsa*'s rhizosphere and assess their biosynthetic potential as potential producers of new biologically active substances. The objects of the study were the genetic diversity and properties of the actinomycetes in the rhizosphere *J. excelsa* in the Crimean peninsula's territory. The subject of the study is the biosynthetic potential of *J. excelsa*'s rhizosphere actinomycetes as producers of a wide range of bioactive compounds, including new antibiotics.

The phylogenetic diversity of actinomycetes isolated from the rhizosphere of *J. excelsa* was studied, and the families and genera to which these isolates belonged were determined. It was found that they represent seven families (*Kribbellaceae*,

Micrococcaceae, *Micromonosporaceae*, *Nocardiaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Pseudonocardiaceae* and *Streptomycetaceae*) and eleven genera (*Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora* and *Streptomyces*) of the class *Actinomycetia*. The largest number of isolates 350 (94% of all) belonged to the genus *Streptomyces*. Notably, for the first time, a representative of the very rare *Actinorectispora* genus of actinomycetes, which currently has only two typical species, was isolated from Ukrainian habitats. The use of direct sowing of soil suspensions without additional sample processing allowed us to isolate the largest number of isolates, including representatives of six genera of actinomycetes (*Amycolatopsis*, *Promicromonospora*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Rhodococcus* and *Streptomyces*).

The influence of culture media on the diversity of isolates was also studied. Most actinomycetes were isolated on ISP3 medium, but all belonged to the genus *Streptomyces*. Moreover, streptomycetes were detected on all media used, and they were quantitatively superior to the other genera. The greatest genus diversity was observed on ISP4 medium (*Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus* and *Micromonospora*) and chitin medium (*Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Nocardia* and *Saccharopolyspora*), while the spectrum of genera between them differed significantly.

The antagonistic properties of the actinomycetes against a diverse range of test microorganism cultures were analysed. A significant number of isolates demonstrated the ability to inhibit the growth of pathogens associated with hospital-acquired infections, including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Proteus vulgaris* and *Candida albicans*. Additionally, more than 60% of the isolates exhibited the capacity to inhibit the growth of at least one of the test cultures of phytopathogenic microorganisms used. Among these, the majority of antagonists were effective against Gram-negative bacteria (*Xantomonas campestris* pv. *campestris*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, and *Erwinia amylovora*), which are responsible for causing bacteriosis in a wide range of crops.

A significant number of the studied natural isolates from the rhizosphere of *J. excelsa* exhibited plant growth-promoting properties, such as the assimilation of

atmospheric nitrogen, solubilization of insoluble forms of phosphorus (P), synthesis of indole-3-acetic acid and production of siderophores. Some isolates displayed a combination of several of these properties, making them promising candidates for the development of biological products for crop production.

Using various approaches, we conducted screenings of biologically active compounds produced by the studied isolates. Dereplicative analysis of secondary metabolite extracts from actinomycete isolates, exhibiting varying spectra and levels of antimicrobial activity, revealed the presence of antibiotics, such as desertomycin A, canhanamycin A, streptorubin B, spectinabilin, antimycins, spiramycins and stambomycins. We employed specific microbial biosensors to screen for producers of particular antibiotic classes. Notably, for the first time, the biosensor strain *S. lividans* TK24 pMO16 was utilized to identify thiopeptide antibiotic producers among natural isolates, resulting in the identification of two isolates that produce berninamycins A and B. The utilization of the *Bacillus subtilis* HB0950 biosensor enabled the identification of 31 isolates with the potential to synthesize bacterial cell wall inhibitor antibiotics. Chemical analysis of extracts from one of these isolates (*Streptomyces* sp. Je 1-6) revealed the presence of the antibiotic lidicamycin and its derivatives. Additionally, the application of a specific biosensor (*S. albus* Δ pseB4 CD10RO1) for pamamycins screening led to the identification of 26 potential producers of these antibiotics.

As a result of routine screening for secondary metabolites on the studied isolates with a broad range of antimicrobial activity, two new antibiotics, furaquinocins L and K, were discovered. These newly found compounds possess a meroterpenoid structure and exhibit similarities to a compound group within the furahinocin family. Notably, these compounds feature modifications of the polyketide-naphthoquinone skeleton in their structures, which have not previously been described in furaquinocins. Specifically, furaquinocin K includes an oxymethyl group in its structure, while furaquinocin L contains an acetylhydrazone moiety. A cluster of genes likely responsible for the biosynthesis of furaquinocins K and L was identified. Furthermore, all key genes involved in the formation of the naphthoquinone core, polyprenyl

synthetase and prenyltransferase were found within the cluster of *Streptomyces* sp. Je 1-369.

A putative biosynthesis pathway for furaquinocins K and L was proposed, considering the predicted functions of the genes found in the cluster and drawing from data on the biosynthesis of furaquinocin C and related compounds. It is probable that the incorporation of the acetylhydrazone moiety into the structure of furaquinocin L takes place at a later stage of biosynthesis, likely involving the aminotransferase gene (Orf 3).

It was observed that furaquinocin K exhibits cytotoxic activity against the HepG2 cell line with an IC₅₀ value of 12.6 µg/ml, but it does not demonstrate antimicrobial activity. Furaquinocin L displays antibacterial activity against Gram-positive bacteria *S. aureus* Newman and *B. subtilis* with MIC₅₀ values of 2 µg/ml and 64 µg/ml, respectively, but it does not exhibit cytotoxic effects. Notably, the furaquinocin L identified in this study is the first furaquinocin to demonstrate antibacterial activity. These described compounds have significant potential for further research and development in the field of antimicrobial therapy.

This study highlights the significant biosynthetic potential of natural actinomycete isolates obtained from the rhizosphere of *J. excelsa*. The discovery of rare actinomycete genera during this research suggests a promising source of novel biologically active substances. Strains exhibiting a wide array of biological activities, including the production of a diverse spectrum of antibiotics, particularly the newly identified meroterpenoids furaquinocins K and L, serve as a foundation for further investigation into their biotechnological potential. The outcomes of this study pave the way for future research into the microbial biodiversity of natural habitats in Ukraine, including the Crimean peninsula. Moreover, the collection of natural actinomycete isolates established during this study can serve as a platform for the development of new therapeutic drugs for medical and veterinary applications, as well as biological products for agriculture.

Keywords: soil microorganisms; actinomycetes; *Streptomyces*; secondary metabolites; antibiotics; biologically active substances; genetic diversity; metabolism; phylogenetic reconstruction; plant growth promotion; assimilation of: iron, Phosphorus, Nitrogen; Nitrogen cycle; furaquinocins; acetylhydrazone.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

Наукові статті

1. Тістечок, С.І., Сирватка, В.Я., Федоренко, В.О., Громико, О.М. (2018). Актиноміцети ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. – антагоністи фітопатогенної мікробіоти. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 23, 340–345. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1038> (Фахове видання України, категорія Б)
2. Rebets, Y., Schmelz, S., Gromyko, O., **Tistechok, S.**, Petzke, L., Scrima, A., Luzhetskyu, A. (2018). Design, development and application of whole-cell based antibiotic-specific biosensor. *Metabolic engineering*, 47, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.019> (Scopus, Web of Science, Q1)
3. Тістечок, С.І., Дацюк, Ю.Р., Федоренко, В.О., Громико, О.М. (2020). Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. Je 1-42: філогенетичний аналіз, біологічні властивості та спектр вторинних метаболітів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 27, 276–281. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v27.1338> (Фахове видання України, категорія Б)
4. **Tistechok, S.I.**, Tymchuk, I.V., Korniyuchuk, O.P., Fedorenko, V.O., Luzhetskyu, A.M., Gromyko, O.M. (2021). Genetic identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. strain Je 1–6 isolated from rhizosphere soil of *Juniperus excelsa* Vieb. *Cytology and Genetics*, 55, 28–35. <https://doi.org/10.3103/S0095452721010138> (Scopus, Фахове видання України, категорія А)
5. **Tistechok, S.**, Myronovskyi, M., Fedorenko, V., Luzhetskyu, A. Gromyko O. (2022). Screening of thiopeptide-producing streptomycetes isolated from the rhizosphere soil of *Juniperus excelsa*. *Current Microbiology*, 79(10), 305. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03004-2> (Scopus, Web of Science, Q2)
6. **Tistechok, S.**, Stierhof, M., Myronovskyi, M., Zapp, J., Gromyko, O., Luzhetskyu, A. (2022) Furaquinocins K and L: Novel naphthoquinone-based meroterpenoids

- from *Streptomyces* sp. Je 1-369. *Antibiotics (Basel)*, 11(11), 1587. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111587> (Scopus, Web of Science, Q1)
7. **Тістечок, С.**, Федоренко, В., Громико, О. (2023) Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. Je 1-93, продуцент антифунгальних антибіотиків. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 88, 17–25. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2023.88.02> (Фахове видання України, категорія Б)
8. **Tistechok, S.**, Roman, I., Fedorenko, V. Luzhetskyu, A., Gromyko, O. (2023) Diversity and bioactive potential of *Actinomycetia* from the rhizosphere soil of *Juniperus excelsa*. *Folia Microbiologica*, 68(4), 645–653. <https://doi.org/10.1007/s12223-023-01047-x> (Scopus, Web of Science, Q3)

Патенти України

1. Громико О.М., **Тістечок С.І.**, Федоренко В.О. Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. ІМВ Ас-5039 - продуцент тіопептидного антибіотика бернінаміцину А : Пат. 122104 Україна : МПК (2020.01) С12N 1/20 (2006.01) С12R 1/465 (2006/01) А61К 31/00. № а 201903180; заявл. 01.04.2019; опубл. 10.09.2020, Бюл. № 17.
2. **Тістечок С.І.**, Громико О.М., Федоренко В.О. Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. ІМВ Ас-5038 – продуцент антибіотика лідикаміцину та його похідних : Пат. 123122 Україна : МПК С12N 1/20 (2006.01) С12R 1/465 (2006.1) G01N 33/569 (2006.01) С12P 17/18 (2006.01). № а 2019 08169; заявл. 15.07.2019; опубл. 17.02.2021, Бюл. №7.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Тістечок С.**, Конечний Ю., Тимчук І., Панас М., Корнійчук О., Федоренко В., Громико О. (2018, 10–12 квітня). Актиноміцети ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. – продуценти антимікотичних сполук. Збірник тез XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 150-151.

2. **Тістечок С.**, Корнійчук О., Тимчук І., Громико О., Федоренко В. (2018, 16–20 квітня). Антибіотична активність актиноміцетів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. – антагоністів MRSA. Третій щорічний регіональний науковий симпозиум в рамках концепції „Єдине здоров’я”, Київ, Україна, 135.
3. **Тістечок С.**, Мицик Ю., Тимчук І., Конечний Ю., Качор А. (2018, 28–30 листопада). Метаболічний профіль та антибактеріальна активність штаму *Streptomyces* sp. Lv 1-120. Збірник тез XIII міжнародної конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери” Харків, Україна, 122-123.
4. Бабко А., **Тістечок С.**, Федоренко В., Громико О. (2019, 9–11 квітня). Вплив плейотропного транскрипційного регулятора Adra на антибіотичну активність штамів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 16-17.
5. Мушинська В., **Тістечок С.**, Мицик Ю., Лужецький А., Федоренко В., Громико О. (2019, 9–11 квітня). Скринінг продуцентів памаміцинів серед актиноміцетних штамів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 24.
6. **Тістечок С.**, Федоренко В., Лужецький А., Громико О. (2021, 19–21 квітня). Аналіз послідовності чернетки генома штаму *Streptomyces* sp. Je 1-369. Збірник тез XVII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 116-117.
7. **Тістечок С.І.**, Мироновський М. Л., Федоренко В. О., Лужецький А. М., Громико О.М. (2022, 25 серпня). Скринінг продуцентів тіопептидних антибіотиків з використанням репортерної системи на основі промотора гена *tipA*. XXII міжнародна Гамовська конференція “The importance of G. Gamow’s ideas for biology of the 21st century”, Одеса, Україна, 115-116.
8. Рибчук А., **Тістечок С.**, Федоренко В., Громико О. (2023, 26–28 квітня) Характеристика актиноміцетів родини Pseudonocardiaceae з ризосфери рослин

кримського півострова. Збірник тез XIX Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 96-97.

9. **Тістечок С.І.**, Ребець Ю.В., Федоренко В.О., Лужецький А.М., Громико О.М. (2023, 11–13 травня) Гетерологічна експресія кластеру генів нового природного антибіотика Je478 у штаммах стрептоміцетів. Збірник тез VII міжнародної науково-практичної конференції “Тернопільські біологічні читання – Ternopil bioscience – 2023”, Тернопіль, Україна, 165-168.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

MDR (Multidrug resistance) – мультирезистентність;

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;

п.н. – пар нуклеотидів;

Orf (Open Reading Frame) – відкрита рамка зчитування;

MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) – Метицилін-резистентний *Staphylococcus aureus*;

ККМПА – Колекція культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків;

ВЕРХ-МС – високоефективна рідинна хроматографія спряжена з мас-спектрометрією;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

ЯМР – ядерно магнітний резонанс;

ФСБ – фосфатно-сольовий буфер;

КУО – колоніє утворююча одиниця;

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація;

БПК – південний берег Криму;

MLSA (Multilocus sequence analysis) – метод аналізу мультилокусних послідовностей;

X-gal – 5-бром-4-хлор-3-індоліл- β -D-галактозид;

X-gluc – 5-бromo-4-хлоро-1H-індол-3-іл β -D-глюкопіранозидуронова кислота;

УФ – ультрафіолет;

ВСС – видимий спектр світла;

MEP (methyl-D-erythritol-4-phosphate) – метил-D-еритритолфосфатний.

ЗМІСТ

ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1. Загальна характеристика бактерій класу <i>Actinomycetia</i>	29
1.1.1. Таксономія, морфологія та життєвий цикл актиноміцетів.....	29
1.1.2. Поширення та екологія актиноміцетів.....	32
1.2. <i>Actinomycetia</i> , як джерело природних біологічно активних сполук.....	35
1.2.1. <i>Streptomyces</i> spp. – найбільше джерело антибіотиків.....	35
1.2.2. Рідкісні роди актиноміцетів та їхня роль у відкритті нових природних сполук.....	38
1.3. Скринінг нових біологічно активних сполук мікробного походження.....	40
1.3.1. Підходи скринінгу нових біологічно активних сполук.....	40
1.3.2. Дослідження нових середовищ існування.....	44
1.3.3. Геномний видобуток як знаряддя відкриття нових біологічно активних сполук.....	47
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	51
2.1. Матеріали досліджень.....	51
2.1.1. Штами мікроорганізмів.....	51
2.1.2. Середовища та умови культивування.....	51
2.1.3. Реактиви.....	52
2.1.4. Праймери.....	52
2.2. Методи досліджень.....	53
2.2.1. Визначення антимікробної активності ізолятів.....	53
2.2.2. Виділення сумарної ДНК з актиноміцетів.....	54
2.2.3. Визначення потенційної фітостимулювальної здатності ізолятів.....	54
2.2.4. Електрофоретичне розділення ДНК в агарозному гелі.....	55
2.2.5. Приготування сумарної ДНК до геномного секвенування.....	55
2.2.6. Полімеразна ланцюгова реакція.....	56
2.2.7. Елюювання фрагментів ДНК із агарозного гелю.....	56
2.2.8. Секвенування ампліфікованих фрагментів ДНК.....	56
2.2.9. Таксономічний аналіз та філогенія ізолятів актиноміцетів.....	57

2.2.10. Мультилокусний аналіз	57
2.2.11. Скринінг продуцентів тіопептидних антибіотиків	58
2.2.12. Скринінг продуцентів памаміцинів	58
2.2.13. Скринінг продуцентів антибіотиків-інгібіторів синтезу пептидоглікану	59
2.2.14. Екстракція та аналіз вторинних метаболітів	59
2.2.15. Дереплікація вторинних метаболітів	60
2.2.16. Екстракція та очищення фурахіноцинів К і L	60
2.2.17. Ядерно-магнітний резонанс	61
2.2.18. Визначення мінімальної інгібувальної концентрації фурахіноцинів К і L	62
2.2.19. Визначення цитотоксичності фурахіноцинів К і L	63
2.2.20. Біоінформатичний аналіз	63
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	64
3.1. Різноманіття та антимікробна активність актиноміцетів ризосфери <i>J. excelsa</i>	64
3.1.1. Філогенія актиноміцетів ризосфери <i>J. excelsa</i>	65
3.1.2. Властивості актиноміцетів ризосфери <i>J. excelsa</i> як продуцентів біологічно активних сполук	72
3.1.2.1. Антимікробна активність	72
3.1.2.2. Потенційні фітостимулювальні властивості	76
3.1.2.3. Метаболічне профілювання окремих ізолятів актиноміцетів	79
3.2. Скринінг продуцентів антибіотиків з використанням біосенсорів	87
3.2.1. Скринінг продуцентів тіопептидних антибіотиків	87
3.2.2. Скринінг продуцентів антибіотиків-інгібіторів синтезу пептидоглікану	97
3.2.3. Скринінг продуцентів макролідних антибіотиків полікетидної природи памаміцинів	102
3.3. Нові нафтохінон подібні меротерпеноїди фурахіноцини К та L	106
3.3.1. Ідентифікація та визначення хімічної структури нових фурахіноцинів	107
3.3.2. Кластер генів та ймовірний шлях біосинтезу нових фурахіноцинів	115

3.3.3. Біологічна активність нових фурахіноцинів	121
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	
ДОСЛІДЖЕННЯ	124
ВИСНОВКИ	137
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	139
ДОДАТКИ	174
Додаток А	174
Додаток Б	179
Додаток В	195
Додаток Г	197
Додаток Д	198

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Актуальність теми

Відкриття антибіотиків та їхнє успішне використання в медицині привело до впевненості у безумовній та постійній ефективності цих сполук для лікування мікробних інфекцій [42]. Вважали, що будь-яке інфекційне захворювання можна вилікувати антибіотиками. Однак, з часом почали з'являтися мікроорганізми, стійкі до антибіотиків, що привело до усвідомлення недосконалості антибіотикотерапії. Розвиток стійкості у мікроорганізмів до антибіотиків виявився неминучим, а їхнє широке розповсюдження – питанням часу [230].

Сьогодні, спостерігають стрімкий розвиток мультирезистентності у патогених мікроорганізмів (англ. Multidrug resistance (MDR)), що представляє серйозну загрозу для здоров'я людини. Найперспективнішим способом вирішення цієї проблеми є впровадження нових антимікробних препаратів. Це в свою чергу зумовлює підвищений інтерес до скринінгу нових природних біоактивних сполук. Людство давно визнало, що мікроорганізми є багатим джерелом сполук з широким спектром терапевтичної дії. Їхні еволюційно відібрані, надзвичайно різноманітні та складні хімічні структури мають більші шанси на біологічну активність, ніж сполуки, отримані шляхом комбінаторного біосинтезу. На сьогодні більше половини комерційних препаратів мають природне походження або розроблені на основі природних сполук [149].

Бактерії класу *Actinomycetia*, добре відомі своєю здатністю продукувати широкий спектр біоактивних сполук. Приблизно дві третини всіх відомих сьогодні антибіотиків продукують актиноміцети, переважно представники роду *Streptomyces* [15]. Проте, виділення та впровадження нових сполук значно сповільнилося. Труднощі з впровадженням нових антибіотиків пояснюють значним повторним відкриттям раніше описаних сполук, особливо серед стрептоміцетів. Одним з підходів до вирішення цієї проблеми є дослідження нових і недостатньо вивчених середовищ існування мікроорганізмів [198].

Перспективною для скринінгу нових природних біоактивних сполук є вузька зона субтропіків середземноморського типу на чорноморському узбережжі Кримського півострова. Значна варіабельність мікрокліматичних умов, велике різноманіття рослинних угруповань із значною кількістю рідкісних і ендемічних рослин сприяло формуванню великого мікробного різноманіття. Однією з таких рослин є ялівець високий (*Juniperus excelsa* M-Bieb.), який, за даними Червоної книги України, віднесений до вразливих видів [263].

Попередні дослідження окремих штамів актиноміцетів, ізольованих із ризосфери рослин Кримського півострова, продемонстрували їхній потенціал, як продуцентів нових біологічно активних сполук. За останнє десятиліття, серед ізолятів цього біотопу виділено продуцентів близько двадцяти нових природних сполук, серед яких олеакеран [168], антрахіноновий антибіотик рубіміцінон А [167], циклічні гексадепсипептидні антибіотики олеаміцини А та В [166], секвітерпен альбафлавенол В [170] та інші. Проте, наявна на момент початку роботи інформація мала уривчастий характер і стосувалася здебільшого властивостей окремих природних ізолятів актиноміцетів, виділених із ризосфери рослин Кримського півострова і їхніх властивостей. У цій роботі ми зосередилися на вивченні колекції актиноміцетів, виділених із ризосфери *J. excelsa*. Лікарські властивості цього виду, а також особливості мікрокліматичних умов, можуть формувати особливе угруповання актиноміцетів, філогенетична характеристика якого дозволить з великою вірогідністю виявити рідкісні роди. Передбачалося, що всебічне дослідження біологічних властивостей ізолятів, головно спектру їхніх вторинних метаболітів, відкриє перспективи до виявлення продуцентів нових природних сполук. Отримані дані дозволять сформування уявлення про різноманіття та біосинтетичний потенціал актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* на території Кримського півострова, а також сформування колекції штамів актиноміцетів – продуцентів антибіотиків, перспективних для розвитку мікробних біотехнологій в Україні.

Мета дослідження – вивчення генетичного різноманіття актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* та оцінка їхнього біосинтетичного потенціалу, в т.ч. як потенційних продуцентів нових біологічно активних речовин.

Для досягнення мети були визначені наступні завдання:

1. Здійснити філогенетичну характеристику актиноміцетів із ризосфери *J. excelsa* на основі нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК;
2. Дослідити антибіотичні властивості ізолятів із використанням широкого спектру мікробних тест-культур;
3. Дослідити фітостимулювальні властивості досліджуваних ізолятів;
4. Виконати метаболічне профілювання екстрактів вторинних метаболітів перспективних ізолятів актиноміцетів на основі їхньої антибіотичної активності та ідентифікувати сполуки, які забезпечують антибіотичну активність досліджуваних ізолятів;
5. Здійснити скринінг продуцентів тіопептидних антибіотиків, антибіотиків інгібіторів синтезу пептидоглікану та антибіотиків групи памаміцинів, використовуючи специфічні мікробні біосенсиори;
6. Виявити нові сполуки, визначити їхні хімічні структури та біологічні активності. Виявити та охарактеризувати гени біосинтезу нових сполук.

Об'єкт дослідження – генетичне різноманіття та властивості актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* на території Кримського півострова.

Предмет дослідження – біосинтетичний потенціал актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* як продуцентів широкого спектру біоактивних сполук, в т.ч. нових антибіотиків.

Методи дослідження: мікробіологічні (культивування ізолятів актиноміцетів, визначення антибіотичної активності та здатності продукувати фітостимулювальні сполуки, методи скринінгу з використанням біосенсорів), молекулярно-генетичні (виділення хромосомної ДНК актиноміцетів, електрофоретичне розділення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, секвенування геному та ампліфікованих фрагментів), біоінформатичні (філогенетичний аналіз, мультилокусний аналіз, аналіз нуклеотидних послідовностей генів, анотація

геному, пошук кластерів генів біосинтезу вторинних метаболітів), фізико-хімічні (екстракція вторинних метаболітів у актиноміцетів, високоефективна рідинна хроматографія мас-спектроскопія (ВЕРХ-МС), дереплікативний аналіз, нормально-фазова хроматографія, ексклюзійна хроматографія, обернено-фазова ВЕРХ).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано на базі структурного підрозділу Колекція культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків (ККМПА), що функціонує при кафедрі генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка, в межах держбюджетних тем Бг-203Н “Колекція культур мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка” (№ держреєстрації 0103U008453, договір №Н/309-2003 від 20.04.2015), Бг-41Нр “Універсальний генетичний механізм контролю продукції біологічно активних речовин стрептоміцетами” (№ державної реєстрації 0116U008070, 2016-2018 рр.), Бг-09Ф “Мутації стійкості актинобактерій до антибіотиків: джерело нових уявлень про механізми резистентності та біотехнологічних знарядь” (№ державної реєстрації 0120U102039, 2020-2022 рр.). Частина досліджень виконано під час наукового стажування на кафедрі фармацевтичної біотехнології Саарландського університету (Німеччина, 2018, 2019-2021 рр.) за індивідуальними грантами FEMS (FEMS-GO-2017-001) та DAAD (№57440918).

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше проведено комплексний аналіз філогенетичного різноманіття та біосинтетичного потенціалу актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* на території Кримського півострова. Встановлено таксономічне положення 372 ізолятів актиноміцетів, які представлені 11 родами (*Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora* та *Streptomyces*). Визначено їхню здатність продукувати антимікробні сполуки проти спектру тест-культур. Досліджено їхні фітостимулювальні властивості. Вперше використано мікробний

біосенсор *S. lividans* ТК24 рМО16 для скринінгу продуцентів тіопептидних антибіотиків серед природних ізолятів актиноміцетів. В результаті чого вперше на території Кримського півострова виділено продуцентів тіопептидних антибіотиків берніаміцинів – *Streptomyces* sp. Je 1-79 та Je 1-613. Ідентифіковано, очищено та встановлено хімічну структуру двох нових нафтохінонвмісних антибіотиків фурахіноцинів К та L, які продукує штам *Streptomyces* sp. Je 1-369. В структурі фурахіноцину L виявлено дуже рідкісний, серед природних сполук фрагмент ацетилгідразону. Виявлено перший, і поки єдиний, фурахіноцин із антимикробною активністю. Запропоновано ймовірний шлях біосинтезу нових фурахіноцинів К та L.

Практичне значення отриманих результатів

Отримані результати демонструють потенціал природних ізолятів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*, як продуцентів широкого спектру біологічно активних сполук, зокрема антибіотиків. У дослідженій колекції природних ізолятів актиноміцетів виявлено продуцентів промислово важливих антибіотиків антиміцинів та спіраміцинів, а також стамбоміцинів, десертومیцину А, берніаміцинів та лідикаміцинів, що підтверджено двома патентами України на винахід. Ідентифіковані в роботі нові антибіотики фурахіноцини, мають практичне та фундаментальне значення. Крім антибіотичної активності у структурі фурахіноцину L міститься рідкісний фрагмент ацетилгідразону, поки не відомо які гени беруть участь у його формуванні. Таким чином, продуцент цих антибіотиків може стати платформою для з'ясування принципів формування гідразоновмісних природних сполук. Створена в ході роботи колекція продуцентів антибіотиків може бути платформою для формування повного циклу виробництва антибіотиків в Україні, що сприятиме зміцненню безпеки у сфері охорони здоров'я. Нуклеотидні послідовності окремих генів та цілих геномів актиноміцетів, отриманих в цій роботі, зареєстровані в міжнародних базах даних (зокрема, GenBank) та є доступними для досліджень науковими групами всього світу.

Особистий внесок здобувача

Формування ідей, планування експериментів, аналіз та обговорення отриманих результатів, підготування рукописів статей та формування основних положень, виконувалось автором спільно з науковим керівником к.б.н. с.д. Громиком О.М. (ЛНУ імені Івана Франка). Увесь обсяг експериментальних досліджень виконано автором самостійно, або за безпосередньої участі. Спільно з науковим керівником охарактеризовано задепоновані в ККМПА 372 ізоляти актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*. Автор самостійно здійснив філогенетичну характеристику ізолятів актиноміцетів, вивчення їхньої антибіотичної, фітостимулювальної активностей, провів скринінг продуцентів антибіотиків, аналіз ВЕРХ-МС хроматограм та очищення нових фурахіноцинів. ВЕРХ-МС аналіз вторинних метаболітів ізолятів та ЯМР виконано в співпраці з к.б.н. Мироновським М.Л та проф. А.М. Лужецьким (Саарландський університет, Німеччина). Визначення антибіотичної та цитотоксичної активності нових фурахіноцинів виконано в співпраці з проф. Р. Мюлером (Гемгольц центр фармацевтичних досліджень, Німеччина). Пошук й аналіз наукової літератури за темою дисертації та її оформлення автор виконав самостійно.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертації були представлені на XIV, XV, XVII, XIX міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 2018, 2019, 2021, 2023); третьому щорічному регіональному науковому симпозіумі в рамках концепції „Єдине здоров'я” (Київ, 2018); XIII міжнародній конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків, 2018); XIII і XV Міжнародна наукова конференція “Фактори експериментальної еволюції організмів” (Івано-Франківськ 2018; Кам'янець-Подільський 2020); XXII міжнародна Гамовська конференція “The importance of G. Gamow’s ideas for biology of the 21st century” (Одеса, 2022); VII Міжнародні науково-практичній конференції “Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2023” (Тернопіль, 2023), а також на наукових семінарах кафедри генетики та біотехнології, та на щорічних звітних наукових конференціях

біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 8 наукових статей серед яких, 4 статті у міжнародних виданнях, які входять до наукометричних баз Scopus та Web of Science (квартиль Q1- Q3), 1 стаття в фаховому виданні України категорія А, яке індексується у наукометричній базі Scopus та Web of Science та 3 статті у фахових виданнях України категорія Б; 2 патенти України на винахід; 9 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях та симпозиумах.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Роботу викладено на 204 сторінках друкованого тексту та проілюстровано 39 рисунками та 7 таблицями.

Список літератури включає 265 найменувань.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика бактерій класу *Actinomycetia*

1.1.1. Таксономія, морфологія та життєвий цикл актиноміцетів

Актиноміцети – грампозитивні здебільшого нитчасті мікроорганізми з високим вмістом гуаніну й цитозину в геномі, які утворюють одну з найбільших таксономічних груп серед представників царства *Bacteria* [125]. Раніше їх вважали, перехідною формою між грибами та бактеріями через міцеліальну будову й здатність до спороутворення. Проте порівняння з грибами є дуже поверхневим, оскільки для актиноміцетів, так само як для прокаріотів, характерна організація спадкового матеріалу в нуклеоїд, а їхня клітинна стінка містить пептидоглікан. Фізіологічно та екологічно більшість актиноміцетів є аеробами (проте трапляються й винятки); крім того вони можуть бути гетеротрофами, але переважно – хемогетеротрофи зі здатністю до використання різноманітних джерел живлення (включно зі складними полісахаридами) [203].

Таксономія актиноміцетів перебуває в постійному перегляді. Все через те, що у систематиці актиноміцетів набирає обертів тенденція зміни молекулярних філогенетичних інструментів у бік філогенії, заснованої на геномі. Проте філогенетичне кластеризування всіх існуючих видів не може бути завершеним, доки не будуть секвеновані геноми усіх типових штамів. За останніми даними клас *Actinomycetia* містить порядки *Actinomycetales*, *Acidothermales*, *Actinocatenisporales*, *Antriccoccales*, *Aquipuribacterales*, *Beutenbergiales*, *Bifidobacteriales*, *Bogoriellales*, *Brevibacteriales*, *Catenulisporales*, *Cellulomonadales*, *Corynebacteriales*, *Cryptosporangiales*, *Demequinales*, *Dermabacteriales*, *Dermatophilales*, *Frankiales*, *Geodermatophilales*, *Glycomycetales*, *Jatrophihabitantales*, *Jiangellales*, *Microbacteriales*, *Micrococcales*, *Micromonosporales*, *Motilibacteriales*, *Nakamurellales*, *Phytomonosporales*, *Propionibacteriales*, *Pseudonocardiales*, *Ruanales*, *Sporichthyales*, *Streptomycineae* та *Streptosporangiales* [181].

Актиноміцети демонструють широке різноманіття морфології: кокоподібні (*Micrococcus* spp.) й паличкоподібні (*Arthrobacter* spp.) форми, фрагментарні

гіфальні форми (*Nocardia* spp.), високо диференційований розгалужений міцелій (*Streptomyces* spp., *Frankia* spp.) [10]. Представники роду *Rhodococcus* утворюють на субстраті витягнуті нитки і не утворюють справжнього міцелію [123], *Corynebacterium* spp. взагалі не формують міцелій, а для актиноміцетів роду *Oerskovia* характерний розпад субстратних гіф на рухливі джгутикові елементи [162].

Для спор актиноміцетів характерна різноманітна топологія поверхні, яка може бути гладкою, бородавчастою, шорсткою, вкритою шипами або волосистою [55]. Роди *Actinoplanes* та *Actinosynnema* характеризуються рухливими спорами, рід *Thermoactinomyces* утворює унікальні термостійкі ендоспори [44]. Для різних родів актиноміцетів притаманні різноманітні структури для утворення спор: склероції (*Chainia*), синнеми (*Actinosynnema*), пухирці (*Frankia*), або пухирці без спор (*Intrasporangium*) [55]. Представники родів *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Sporichthya* та деяких *Nocardia* spp. мають короткі ланцюжки спор, тоді як представники родів *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Kitasatospora*, *Streptoverticillium* та деякі *Nocardia* spp. утворюють дуже довгі ланцюжки чисельністю до 100 спор [90].

Ще однією цікавою особливістю актиноміцетів є їхня здатність до утворення меланоїдних пігментів, які можуть бути червоними, жовтими, помаранчевими, коричневими, синіми або чорними залежно від штаму, середовища та віку культури. Меланіни відіграють вирішальну роль у покращенні виживання та конкурентоспроможності актиноміцетів [47].

Життєвий цикл актиноміцетів починається із проростання спори, яка розростаючись, утворює вегетативні гіфи, які в свою чергу формують складно розгалужений вегетативний міцелій (рис. 1.1.). Визначною особливістю вегетативних гіф актиноміцетів є їхній ріст шляхом потовщення кінчика на відміну від таких одноклітинних бактерій як *Bacillus subtilis* й *Escherichia coli*, в яких подовження клітин досягається шляхом включення нового матеріалу в бічну клітинну стінку [75].

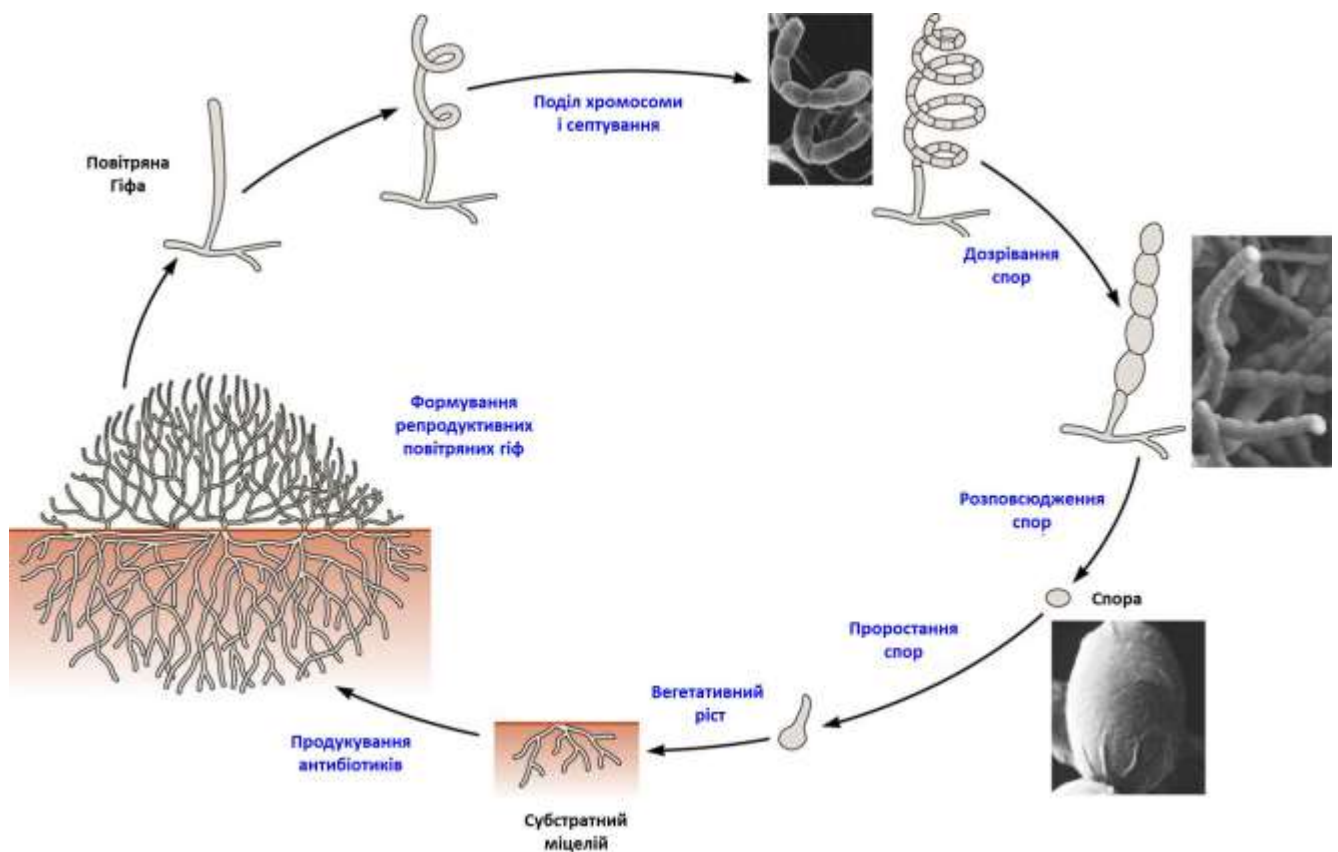


Рис. 1.1. Схематичне зображення життєвого циклу спороутворюючих актиноміцетів за [15].

Експоненціальний ріст вегетативних гіфів досягається поєднанням росту верхівки та галуження. Той факт, що внаслідок поділу клітин під час вегетативного росту утворюються не нові клітини, а поперечні перегородки, які розділяють гіфи на окремі компартменти з копією хромосоми, робить актиноміцети винятковими бактеріями [41; 61]. За несприятливих умов, наприклад браку поживних речовин, вегетативний міцелій актиноміцетів автолітично деградує за допомогою механізму, подібного до запрограмованої клітинної смерті, утворюючи рельєфні спорогенні структури – повітряні гіфи [139; 140]. Також під час цього періоду життєвого циклу актиноміцети утворюють більшість вторинних метаболітів, зокрема антибіотиків [22; 229]. Це зумовлено необхідністю захисту пулу поживних речовин субстрату, необхідних для формування повітряного міцелію, від конкурентних мікроорганізмів у середовищі

існування [63; 102; 176]. Повітряні гіфи надають колоніям характерний пухнастий вигляд і з часом диференціюють, утворюючи ланцюжки одноядерних спор [65].

1.1.2. Поширення та екологія актиноміцетів

Актиноміцети є важливими мікроорганізмами в екосистемах земної поверхні, де вони займають різні екологічні ніші і відіграють важливу роль у біологічних процесах. Більшість актиноміцетів є сапрофітними вільноживучими мікроорганізмами, які широко розповсюджені як у наземних (грунт, повітря), так й у водних екосистемах (зокрема у солоних водоймах) [129]. Проте для більшої частини цієї групи бактерій, в тому числі стрептоміцетів, характерним є ґрунтове середовище існування, або вони проводять там більшу частину свого життєвого циклу у вигляді спор, які є своєрідною формою адаптації в умовах обмеженого доступу відповідних джерел живлення [53]. Їх виявляють як на поверхні ґрунту, так і на глибині понад 2 м. Актиноміцети найбільше люблять лужні та багаті на органіку ґрунти, де вони складають важливу частину мікробного біоценозу [70].

Склад і функціональність ґрунтової мікробіоти регулюють абіотичні характеристики ґрунту, зокрема рН, текстуру, поживні речовини та доступність вологи. Щільність актиноміцетів складає 10^6 - 10^9 клітин на грам ґрунту [202]. Як і решта ґрунтових бактерій, актиноміцети здебільшого мезотермофіли із температурним оптимумом росту від 25 до 30°C, однак термофільні представники можуть зростати при температурі від 50 до 60°C [60]. Щодо впливу вологості, то низький її рівень сприяє вегетативному росту цих прокариотів, тоді як зростання її значення обмежує або зупиняє ріст актиноміцетів. Більшість актиноміцетів ростуть у нейтральних або слаболужних ґрунтах зі значенням рН від 6 до 9; проте, варто зазначити, що деяких представників стрептоміцетів виділяли з кислих ґрунтів (рН=3,5) [103].

Актиноміцети виконують важливу роль у поживному циклі та біохімічному складі ґрунту, як одні з найактивніших деструкторів органічної речовини в ґрунті. Цей процес є важливим для забезпечення доступних елементів живлення рослин

та інших мікроорганізмів в ґрунті. Крім того, деструкція органічної речовини веде до утворення гумусу – важливого компоненту ґрунту, забезпечуючи його структуру та властивості [21].

Водночас, актиноміцети здатні продукувати біологічно активні речовини, які можуть мати вплив на збільшення врожайності рослин, підвищення їхньої стійкості до стресових факторів, а також на покращення якості ґрунту. Значна кількість актиноміцетів здатні продукувати індол-3-оцтову кислоту (ІОК) – ауксин, який утворюється в результаті метаболізму L-триптофану. Цей фітогормон здатний покращувати ріст рослин, стимулювати проростання насіння, закладання та ріст коренів, а також ріст проростків [144]. Крім того, актиноміцети здатні солубілізувати нерозчинні форми фосфату, що має значний позитивний вплив на ріст рослин. У стрептоміцетів це забезпечується шляхом синтезу лужних та кислих фосфатаз [200]. Актиноміцети є однією з найважливіших груп бактерій, які здатні синтезувати сидерофори. Ці прокаріоти синтезують низку сидерофорів, які покращують ріст зернових культур. Зокрема, штам *Nocardiosis dassonvillei* MB22 сприяє росту проростків пшениці [6]. Продукування сидерофорів актиноміцетами також створює так званий “залізний голод” для фітопатогенних бактерій і грибів, обмежуючи для них доступність Fe^{3+} , що унеможлиблює їхній ріст [79]. Представники роду *Frankia* здатні фіксувати атмосферний азот у симбіозі з актиноризними рослинами, допомагаючи їм колонізувати бідні на Нітроген ґрунти [190]. Деякі дослідження азотфіксувальних властивостей серед актиноміцетів виявили, що несимбіотичні види родів *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* і *Propionibacteria* також здатні фіксувати атмосферний азот. Насичення ґрунту біодоступними формами Нітрогену істотно впливає на його родючість, що веде до покращення росту та врожайності рослин [27].

Не менш важливою є здатність актиноміцетів продукувати антимікробні метаболіти, що перешкоджає зараженню ґрунту та, відповідно, рослин [223]. Зазвичай вони використовують комбінацію кількох антагоністичних механізмів (синтез антибіотиків, сидерофорів та літичних ферментів) для боротьби з

фітопатогенами [112]. Численні дослідження довели успішність актиноміцетів як чинників біоконтролю фітопатогенів [59]. Наприклад, штами *S. bellus* і *S. saprophyticus* здатні солубілізувати Фосфор і Калій та пригнічувати гриби роду *Fusarium*, захищаючи корені цукрового буряку від гнилі [1].

Актиноміцети також здатні взаємодіяти з еукаріотичними організмами. Їх виявляють в екзоскелеті деяких тропічних мурах, легенях та шкірі ссавців, а також в коренях та інших органах рослин. На відміну від родів *Streptomyces*, *Kineococcus* і *Mycobacterium* поширених у різноманітних екосистемах, роди *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Kocuria* та *Rothia*, здебільшого асоційовані з господарями [118]. Такі взаємодії можуть бути, як взаємовигідні, так і завдавати певної шкоди для господаря. Наприклад, роди *Frankia* та *Micromonospora*, утворюють мутуалістичний симбіоз формуючи азотфіксувальні актинобульбочки на коренях бобових рослин і відіграють ключову роль у фіксації азоту [107; 224]. Крім того, актиноміцети тісно взаємодіють із мурахами-листорізами, захищаючи їх від патогенних грибів і бактерій, шляхом вироблення валіноміцину, антиміцинів і актиноміцинів. Наприклад, актиноміцети роду *Pseudonocardia* підтримують делікатно збалансовану систему, яка включає джерело живлення мурах – гриб *Leucoagaricus gongylophorus*. Цей рід актиноміцетів продукує низку протигрибкових сполук (дентигеруміцини, кандицидин та варіанти ністатину), які пригнічують патогенні гриби *Escovopsis spp.*, але не впливають на ріст симбіонта мурашок *L. gongylophorus*. [17].

Окрім корисних взаємодій, актиноміцети можуть виявляти й негативний вплив на асоційованого господаря. Зокрема, деякі представники роду *Mycobacterium* спричиняють туберкульоз (*Mycobacterium tuberculosis*), проказу (*M. leprae*) та інші захворювання у людей та інших ссавців [185]. У рослин патогенні штами роду *Streptomyces*, зокрема *S. scabies*, мають спільний острів патогенності, що дозволяє їм інфікувати значну кількість вищих рослин та спричиняти різні захворювання [124].

1.2. *Actinomycetia*, як джерело природних біологічно активних сполук

1.2.1. *Streptomyces* spp. – найбільше джерело антибіотиків

Рід *Streptomyces* включає аеробні грампозитивні бактерії, які утворюють добре розгалужений субстратний і повітряний міцелії зі складним життєвим циклом. Стрептоміцети поширені практично всюди, однак основним природним середовищем їхнього існування є ґрунт [70; 228]. Цей типовий рід актиноміцетів є одним із найбільших таксонів бактерій, що включає приблизно 700 видів із дійсними опублікованими назвами [264]. Стрептоміцети є одним з найбільших природних джерел антибіотичних сполук з антибактеріальними, протигрибковими, противірусними, антитромботичними, імуносупресорними, протипухлинними та іншими властивостями. Представники цього роду продукують більшість антибіотиків різноманітної хімічної будови (макроліди, тетрацикліни, аміноглікозиди, глікопептиди, ансаміцини, терпени тощо), які сьогодні використовують в медицині, ветеринарії та сільському господарстві [149].

Історія відкриття антибіотиків стрептоміцетного походження почалася в 1940 році, коли було відкрито перший антибіотик отриманий з актиноміцетів – актиноміцин, який зазвичай використовується, як хіміотерапевтичний засіб для лікування різноманітних видів раку [233]. Через два роки було виділено стрептотрицин з *S. lavendulae* [232], а потім стрептоміцин із *S. griseus* [187]. За відкриття стрептоміцину, першого антибіотика активного проти збудника туберкульозу, в 1952 році Зельман Ваксман отримав Нобелівську премію.

З відкриттям стрептоміцину вчені активізували пошуки антибіотиків, а основними об'єктами скринінгу стали бактерії роду *Streptomyces*. Впродовж 20 років було виявлено більшість класів антибіотиків, які до сьогодні застосовують як лікарські препарати. Значні успіхи виявлення антибіотиків протягом цього періоду увійшли в історію як “золота ера” відкриття антибіотиків [83]. Крім стрептоміцину, були ідентифіковані тетрациклін (1948, *S. rimosus*), хлорамфенікол (1949, *S. venezuelae*), лейкоміцин (1952, *S. kitasatoensis*), ванкоміцин (1956, *S. orientales*), канаміцин (1957, *S. kanamyceticus*) та інші (рис. 1.2.). З усіх

антибіотиків, які були відкриті в період “золотої ери”, 55% продукували представники роду *Streptomyces*.



Рис. 1.2. Оновні антибіотики виділені зі стрептоміцетів за [164].

Насправді, швидке і, відносно, легке відкриття протягом досить короткого періоду часу привело до ідентифікації найпоширеніших класів природних антибіотиків та їхніх похідних. Однак, це не стримувало продовження пошуку нових сполук. Яскравим прикладом є виділення на початку 1970-х років штаму *S. avermitilis*, який продукує авермектини [31]. Похідне авермектину, івермектин, є, мабуть, найефективнішим і найбезпечнішим препаратом у світі для лікування та профілактики різноманітних захворювань і станів людини [32; 211]. Важливість і значення відкриття та розробки цих сполук було визнано Нобелівською премією з фізіології та медицини 2015 року.

Сьогодні стрептоміцети є одним з ключових об'єктів для скринінгу нових біологічно активних сполук. Протягом 2015 – 2020 років зі стрептоміцетів виділили 279 нових природних сполук із різною біологічною активністю [57]. Зокрема, 92 сполуки з антибактеріальною активністю проти широкого спектру патогенів, включаючи мультирезистентні штами, 82 нові протипухлинні сполуки, 33 сполуки з протигрибковою активністю та інші.

В ході відкриття антибіотиків помічено, що окремі види стрептоміцетів продукували не одну, а декілька антибіотичних сполук. Наприклад, *S. coelicolor* здатний продукувати актинородин, ундецилпродигіозин, кальцій-залежний антибіотик і метиленоміцин, кластер генів останнього знаходиться на плазміді [163]. Проте, коли послідовність геному *S. coelicolor* була секвенована та опублікована [20], став очевидним справжній потенціал цього штаму, як продуцента природних сполук. В геномі *S. coelicolor* ідентифікували понад 20 кластерів генів біосинтезу вторинних метаболітів [37], зокрема кластер генів криптичного полікетидного антибіотика [160]. Зі збільшенням кількості секвенованих геномів стрептоміцетів, стало зрозуміло, що така кількість кластерів вторинних метаболітів є швидше нормою, аніж винятком, до того ж деякі штами стрептоміцетів містять близько 70 різних кластерів генів синтезу вторинних метаболітів [58; 116]. Проте, більшість із цих кластерів генів є мовчазними і не експресуються за лабораторних умов. Попри те, що значна кількість геномів стрептоміцетів просеквенована та виявлено велику кількість кластерів генів біосинтезу антибіотиків, їхній потенціал як продуцентів біоактивних сполук ще недостатньо досліджений. Значна кількість генів біосинтезу перебуває у мовчазному стані, що не дає можливості з'ясувати хімічну структуру і біологічні властивості закодованих сполук, які потенційно можуть продукувати стрептоміцети. Подальші дослідження з активування криптичних генів біосинтезу, застосування підходів до гетерологічної експресії кластерів генів біосинтезу вторинних метаболітів, інші підходи, дозволять в повній мірі оцінити біотехнологічний потенціал стрептоміцетів як джерела нових природних біоактивних сполук.

1.2.2. Рідкісні роди актиноміцетів та їхня роль у відкритті нових природних сполук

Actinomycetia надзвичайно різноманітний клас бактерій, більшість з яких можуть продукувати антибіотичні сполуки. Значні успіхи відкриття нових антибіотиків в межах роду *Streptomyces* дещо відсунули на другий план інших представників цього класу бактерій. Крім того, використання традиційних методів виділення актиноміцетів призводило до ізоляції в основному стрептоміцетів, а частка рідкісних родів була набагато нижчою [92]. До рідкісних актиноміцетів відносять роди *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Actinokineospora*, *Acrocarpospora*, *Actinosynnema*, *Catenuloplanes*, *Cryptosporangium*, *Dactylosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Kineosporia*, *Kutzneria*, *Microbiospora*, *Microtetraspora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Saccharothrix*, *Streptosporangium*, *Spirilliplanes*, *Thermomonospora*, *Thermobifida*, *Virgosporangium*, *Micromonospora* та інші [8]. Варто зазначити, що рідкісні актиноміцети мають повільний темп росту та кількісно меншу популяцію порівняно зі *Streptomyces*, а також їм необхідні певні умови росту, і вони призводять до відмінних фізіологічних властивостей.

На відміну від стрептоміцетів, рідкісні актиноміцети значно важче виділити з ґрунту чи іншого середовища, а також вони потребують специфічних умов культивування в результаті чого їх складно культивувати в лабораторних умовах [207]. Тому, здебільшого досліджували вторинні метаболіти стрептоміцетів, які є менш вибагливими до умов лабораторного культивування. Однак, криза відкриття нових антибіотиків, яка виникла наприкінці ХХ століття, змусила звернути увагу дослідників на інші роди актиноміцетів [115]. Серед них вже відомими були продуценти еритроміцину (*Saccharopolyspora erythraea*), рифампіцину (*Amycolatopsis mediterranei*), гентаміцину (*Micromonospora purpurea*) та інших. Це спонукало до пошуку нових сполук з “рідкісних актиноміцетів”. В результаті було виявлено такі сполуки, як тейкопланін (*Actinoplanes teichomyceticus*), фортиміцин (*M. olivoasterospora*), розаміцин (*M. rosaria*) і нокардицин (*Nocardia uniformis*).

В останні два десятиліття частка антибіотиків, виділених з рідкісних актиноміцетів зросла до 25–30% від усіх відкритих антибіотиків за цей час. Особливу увагу у цьому аспекті привертають представники родини *Micromonosporaceae*, дещо менша кількість антибіотиків виявлена з родин *Pseudonocardiaceae* і *Thermomonosporaceae* [222]. За період з 2008 по 2018 роки з рідкісних актиноміцетів виділили 341 нову сполуку, більшість з яких належали до класів циклічних пептидів та хінонів. При цьому, найбільший потенціал продемонстрували представники родів *Amycolatopsis*, *Actinomadura* та *Micromonospora* [56]. Серед нових сполук виявлено протипухлинні антибіотики 2'-О-сукциніл-апоптолідин А, 3'-О-сукциніл-апоптолідин А (*Amycolatopsis* sp. ICBB 8242), міаолієнон (*A. miaoliensis* BCRC 16873) і брартеміцин (*Nonomuraea* sp.) [85; 193; 225]. Штам *Actinomadura* sp. КС 191 продукує антибіотик актиномадуrol, який виявив високий рівень активності проти *Staphylococcus aureus*, *Proteus hauseri* та *Kocuria rhizophila* (значення МІК 0,39–0,78 мкг/мл) [194]. Антимікотична сполука нокардитоцин, активна проти референтних та рифампіцин стійких штамів *M. tuberculosis* (значення МІК 0,025–1,56 мкг/мл), виділено з *Nocardia pseudobrasiliensis* IFM 0757 [142]. Представник роду *Saccharothrix* (штам SA198) продукує сполуки А4 і А5, які виявляють високий рівень протигрибкової активності проти *Mucor ramannianus*, *Aspergillus carbonarius* і *Penicillium expansum* [26].

Аналіз геномів рідкісних родів актиноміцетів показав, що біосинтетичне різноманіття вторинних метаболітів значно залежить від роду бактерії. При цьому їхня кількість корелює з кількістю генів та розміром геному [58]. Зокрема, було виявлено, що роди *Amycolatopsis*, *Kutzneria* та *Micromonospora* мають найбільшу біосинтетичну різноманітність [67]. Ці дані вкотре доводять, що представники рідкісних родів актиноміцетів мають великий потенціал продукувати біологічно активні сполуки.

1.3. Скринінг нових біологічно активних сполук мікробного походження

Актиноміцети мають велике значення для біотехнології, медицини та сільського господарства завдяки їхній здатності продукувати широкий спектр біологічно активних сполук [5]. Однак, за останні 30 років в клінічну практику введено лише два нових класи антибіотиків, лінезолід (Pfizer) і даптоміцин (Cubist) для лікування системних інфекцій [43; 164]. У той же час мікробна резистентність до наявних антибіотиків різко зросла, ускладнюючи лікування мікробних інфекцій. Сьогодні існує реальна загроза повернення людства до ери доантибіотичного лікування, коли рутинні хірургічні та хіміотерапевтичні процедури можуть бути вкрай небезпечними через інфекції, викликані мікроорганізмами, стійкими до антибіотиків. З огляду на це, сьогодні існує нагальна потреба в нових антибіотиках, які є найкращим рішенням у боротьбі зі стійкістю патогенних мікроорганізмів [134]. Проте, сьогодні виділення нових антибіотиків стає дедалі складнішим. Це пов'язано зі значним повторним відкриттям вже відомих сполук. Очевидною є необхідність змін стратегії та підходів скринінгу нових біологічно активних сполук, а також відновлення природного скринінгу.

1.3.1. Підходи скринінгу нових біологічно активних сполук

Виявлення нових природних сполук базується на двох основних підходах: “зверху вниз” або прямих скринінг (англ. top-down) і “знизу вгору” або зворотній скринінг (англ. bottom-up) [127; 150].

Підхід “знизу вгору” передбачає систематичний скринінг штамів та їхніх природних сполук з метою виявлення конкретної активності. Цей підхід не передбачає секвенування геному або використання складних генетичних маніпуляцій. На початковому етапі відбирають зразки матеріалів для виділення мікроорганізмів, підбирають умови їхнього культивування та оцінюють антибіотичну активність окремих ізолятів. Далі, активні екстракти фракціонують та перевіряють на відповідну біологічну активність. Так відбувається аж до

отримання фракції очищеної сполуки, яка використовується для встановлення її хімічної структури. Цей метод найкраще підходить для виявлення сполук, які культура синтезує в достатній кількості без необхідності використання спеціальних умов культивування.

Зельман Ваксман є одним з перших науковців, хто впровадив такий систематичний скринінг у 1940 році. Використовуючи цей підхід, він виділив низку антибіотиків, які до сьогодні використовують у клінічній практиці [106]. Однак, важливим обмежувальним фактором в підході “знизу вгору” є лімітована чутливість і ефективність, зокрема через аналіз біоактивності. Це означає, що потенційно цікаві сполуки могли залишатися непоміченими, особливо якщо вони наявні в низьких концентраціях або приховані активністю інших, більш поширених сполук. Тому, щоб повністю охопити скринінг підходом “знизу вгору”, варто згадати і про метаболічне профілювання екстрактів природних ізолятів актиноміцетів. Цей метод є досить гнучким і передбачає використання різних аналітичних підходів, зокрема вискоефективну рідинну хроматографію спряжену з мас-спектрометрією (ВЕРХ-МС) для аналізу екстрактів вторинних метаболітів. ВЕРХ-МС має широкий спектр застосування і може використовуватися для ідентифікування нових або вже відомих природних сполук [242].

Хоча використання традиційного підходу скринінгу дозволило успішно ідентифікувати багато біологічно активних природних сполук, розширення обсягу геномних даних змінило уявлення про біосинтетичний потенціал та метаболічні можливості мікроорганізмів, особливо актиноміцетів. З поступовим секвенуванням геномів стало зрозуміло, що в середньому бактерії роду *Streptomyces* містять 25-50 кластерів вторинних метаболітів, з яких лише близько 10% експресуються в лабораторних умовах [121]. Це спричинило ренесанс у відкритті природних сполук і привело до розробки нових підходів, заснованих на геноміці [237].

Постійне збільшення геномних даних та прогрес технологій зумовили виникнення нового підходу в скринінгу нових природних сполук, за яким

спочатку ідентифікують потенційно цікаві кластери генів біосинтезу, активують їх та вивчають наявність нових природних сполук [150]. Такий підхід скринінгу природних сполук називають “знизу вгору” або зворотній скринінг [127]. Для прогнозування потенційно цікавих кластерів генів використовують біоінформатичні інструменти, які мають доступ до баз даних раніше охарактеризованих кластерів генів, порівнюють їх з досліджуваним геномом і виявляють регіони з подібними генами [38].

Важливим елементом скринінгу за підходом “знизу вгору” є ідентифікація та вибір досліджуваних кластерів генів біосинтезу. Біоінформатичні інструменти дають змогу прогнозувати кластери генів, а відтак і природу сполуки, яку вони кодують. У випадку виявлення кластеру генів, який не експресується в стандартних умовах, або, відповідно до певних стресових чинників, існують методи активування цих кластерів генів [121].

Одним з таких методів активації “мовчазних” кластерів генів, є використання плейотропних регуляторів. Зокрема, ген *adpA*, який кодує регуляторний білок AdpA (родина транскрипційних регуляторів AraC–XylS) та контролює експресію значної кількості генів [80; 130]. AdpA також може впливати на морфогенез стрептоміцетів [151]. Маніпуляції з цим глобальним регулятором привели до активування синтезу ангуциклінону овієдоміцину у *S. ansochromogenes* [239] та люцензоміцину в *S. cyanogenus S136* [241]. Використання цього глобального регулятора в природному ізоляті *Streptomyces* sp. Pv 4-95 привело до активування синтезу флаваколу та його похідного 3- β -гідрокси флаваколу [219].

Іншим ефективним способом активування синтезу природних сполук є гетерологічна експресія кластерів генів біосинтезу вторинних метаболітів, які не функціонують з різних причин у батьківському штамі. Таким методом можна експресувати один, кілька генів, або цілий біосинтетичний кластер. При цьому для більшості штамів-господарів, використовуваних для гетерологічної експресії, розроблені молекулярно-біологічні методи, які дозволяють оптимізувати ці штами залежно від експресованого кластеру [13]. Штам-господар може бути специфічно

модифікований, щоб продукувати природні сполуки певного типу. Інший спосіб модифікування штаму-господаря включає інактивацію його власних кластерів генів вторинних метаболітів, що приводить до стимулювання експресії гетерологічного кластеру та дає більш чистий вихід цільової сполуки. Нещодавно, проф. Андрій Лужецький зі співавт. створив два штами стрептоміцетів із делетованими кластерами вторинних метаболітів. У штамі *S. albus* Del14 [145], делетовано 15 кластерів генів вторинних метаболітів та штаму *S. lividans* Ya8 [3] із видаленими 8 кластерами генів. Розроблені штами використовують для експресії певних типів природних сполук. Наприклад, *S. albus* Del14 успішно використовують для експресії полікетидних вторинних метаболітів, тоді як *S. lividans* краще експресує генні кластери, які кодують сполуки на основі амінокислот, таких як RiPPs і нерибосомальні пептиди. Використання цих штамів для гетерологічної експресії дали змогу ідентифікувати нові природні сполуки, такі як депсипептиди міраміді [159], дудоміцини [113] та інші.

Ще одним підходом виявлення природних сполук є застосування специфічних мікробних біосенсорів, здатних реагувати на певні сполуки [206]. Такі мікробні біосенсори зазвичай складаються з трьох модулів: (I) модуля введення сигналу, заснованого на ліганд-регульованому факторі транскрипції; (II) регуляторного модуля, що складається з залежного від промотора модуля I; (III) модуля виведення сигналу, представленого зазвичай репортерним геном або геном стійкості до антибіотиків, який дозволяє виявляти, записувати та кількісно оцінювати сигнал (рис. 1.3.) [50; 174].

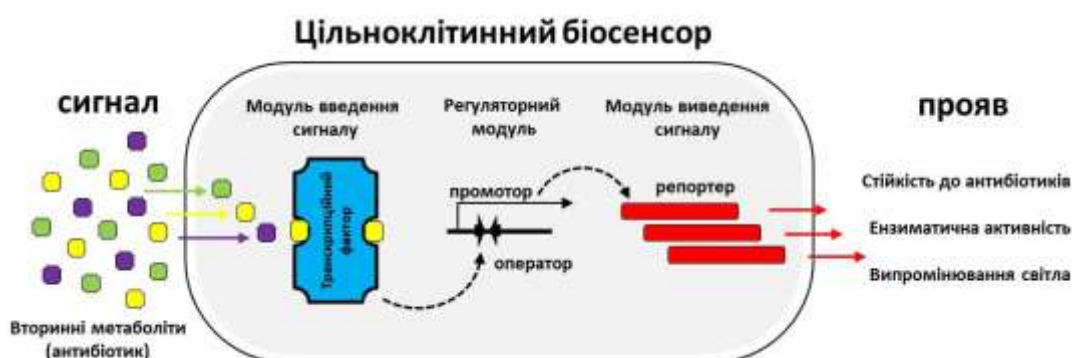


Рис. 1.3. Схематичне зображення цільноклітинного біосенсора за [174].

Розроблені цільноклітинні біосенсори успішно використовували для скринінгу антибіотиків. Біосенсор на основі двокомпонентної системи LiaRS застосовують для скринінгу антибіотиків інгібіторів синтезу пептидоглікану [135], біосенсор на основі двокомпонентної сигнальної системи LnrJK – для специфічного виявлення амфотерициноподібних полієнів [175], а також специфічний біосенсор для скринінгу памаміцинів [174] та інші.

Описані в цьому розділі підходи скринінгу є вдосконаленням певного етапу в класичній моделі виявлення природних сполук. Інтеграція цих вдосконалень може призвести до значного збільшення кількості виявлених нових природних сполук. Зокрема, поєднання різних підходів скринінгу в дослідженні окремо взятого штаму актиноміцетів дозволить всебічно оцінити його потенціал до продукування біологічно активних сполук.

1.3.2. Дослідження нових середовищ існування

Значна кількість виявлених у природі стрептоміцетів і проблема повторного відкриття вже відомих сполук призвели до природного зниження інтересу до ґрунтових мікроорганізмів. Оскільки більшість антибактеріальних сполук походять із ґрунтових або водних ізолятів актиноміцетів [51], дослідники зосередилися на мікроорганізмах, які виділені з недостатньо вивчених та незвичних середовищ існування [46]. Мікроорганізми, виділені з таких середовищ, можуть мати інтерес не лише як джерело таксономічного різноманіття актиноміцетів, але й через їхнє генетичне різноманіття та потенціал до синтезу нових біологічно активних речовин [81].

Морські екосистеми одні з найбагатших і недостатньо вивчених середовищ існування мікроорганізмів, які мають великий потенціал для відкриття нових і хімічно різноманітних природних сполук. Ці екосистеми мають значне мікробне різноманіття, які становлять природну базу для пошуку потенційних лікарських засобів ефективних для боротьби зі складними мікробними захворюваннями [25]. Останніми десятиріччями спостерігають значний прогрес у дослідженні цих мікроорганізмів, включаючи актиноміцети. Було виділено низку продуцентів

нових біологічно активних сполук різноманітної хімічної будови [49; 133]. Варто виокремити напірадіоміцини, унікальний клас меротерпеноїдів з різними моделями галогенування, які проявляють значну інгібіторну активність проти MRSA [34], а також два нові спіротетронати, лобофорин L і M із антибактеріальною дією проти грампозитивних бактерій [126] та інші.

Дослідження рідкісних родів морських актиноміцетів дають дуже обнадійливі результати. З представників цих родів виділено значну кількість біологічно активних сполук із перспективними властивостями [54]. Зокрема, зі штаму *Actinomadura* sp. АКА43, який виділений з плаваючих частинок на глибині затоки Сагамі (Японія) було отримано три нові полікетиди класу тетронат – номіміцини В, С і D, які активні проти *Kocuria rhizophila* та *B. subtilis* [243]. У цьому ж місці на глибині 800 м виділено інший штам актиноміцетів *Nonomuraea* sp. АКА32, який продукує аказаміцин з протипухлинною активністю [240]. А також, зі штаму *Nocardiosis* sp. НВ-J378 виділили нокардіопсистини А-С – ангуцикліни з родини полікетидів, які виявляли антибактеріальну активність щодо MRSA [238].

Окрім виділення актиноміцетів із морських середовищ, сьогодні активно досліджують зразки ґрунтів зібраних в наземних екстремальних середовищ існування [29; 62; 173; 197]. Одним з таких середовищ є пустельні ґрунти, з яких було виділено значну кількість актиноміцетів [71]. Ці бактерії були представлені родом *Streptomyces*, а також рідкісними родами *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Nocardiosis*, *Nonomuraea*, *Saccharopolyspora* і *Saccharothrix*. У геномах деяких із цих ізолятів виявлено кластери генів синтезу численних нових природних сполук, а окрім цього вони містять гени, пов'язані зі стресом, які дають розуміння механізмів адаптації актиноміцетів до екстремальних умов навколишнього середовища [84]. Зокрема, штам *Streptomyces* sp. *myrophorea* McG1, виділений із лужного ґрунту посушливої місцевості Бохо (Північна Ірландія), здатний рости під інтенсивним γ -випромінюванням (4 кГр) та при рН 10,5. Крім того, цей штам є потенційним джерелом нових природних сполук, які пригнічують патогенів ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,

Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* та *Enterobacter* spp.), а особливо проти стійкого до карбапенему *A. baumannii* (важливий патоген у списку пріоритетних антибіотикорезистентних бактерій у списку Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ)), резистентного до ванкоміцину *Enterococcus faecium* та метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* (англ. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)) (обидва штами ідентифікують, як високопріоритетні патогени) [214].

Особливим середовищем існування актиноміцетів є ендосфера рослин, яка є потенційним сховищем нових біологічно активних сполук, оскільки існує близько 300 000 видів рослин, кожен з яких містить один або кілька типів ендофітів [205]. Janso та Carter виділили 123 штами актиноміцетів із 256 зразків тканин (листя, коріння, стебла тощо), зібраних із 113 рослин. Філогенетичний аналіз цих ізолятів виявив, що лише третина ендофітних актиноміцетів належала до родини *Streptomycetaceae* [91]. Таким чином, ендосфера рослин може бути цінним джерелом для виявлення рідкісних родів актиноміцетів. Порівняльний аналіз філогенії ізолятів, виділених із коренів рослин, ризосфери і ґрунту вказує на значні відмінності між ними на рівні роду. При цьому, велика кількість ізолятів актиноміцетів, що належить до рідкісних родів, були виділені з ендосфери коренів рослин. Вважається, що поява рідкісних родів актиноміцетів у ґрунті пригнічується наявністю штамів роду *Streptomyces* [137].

Мікробне різноманіття природних біотопів України є надзвичайно мало вивченим. Унікальною, з точки зору рослинного, а відтак мікробного, різноманіття, є вузька смуга субтропіків середземноморського типу на чорноморському узбережжі Кримського півострова від мису Айя до Алушти, яка обмежена висотами не більше 200-300 м над рівнем моря. В межах цієї зони росте велика кількість рідкісних та ендемічних рослин. Нечисленні попередні дослідження нашої лабораторії у співпраці із групою проф. А. Лужецького (Саарландський університет, Німеччина), продемонстрували потенціал окремих ізолятів актиноміцетів ризосфери рослин Кримського півострова, як продуцентів нових біологічно активних сполук. Серед цих ізолятів було виявлено продуцентів низки нових природних сполук, серед яких олеакеран [168], антрахіноновий

антибіотик рубіміцінон А [167], циклічні гексадепсипептидні антибіотики олеаміцини А та В [166], та інші. Крім того, з цього біотопу виділено продуцентів нових похідних вже відомих сполук, таких як секвітерпен альбафлавенол В [170], ансаміцин з групи кендоміцинів – кендоміцину Е [158], 3-β гідрокси флавакол [219] та інші. Ці дані демонструють потенціал згаданого біотопу, як джерела нових біологічно активних сполук із антимікробною дією. Продовження досліджень мікробного різноманіття Кримського півострова може сприяти виявленню нових сполук з цікавими біологічними властивостями, зокрема і антибіотичними.

1.3.3. Геномний видобуток як знаряддя відкриття нових біологічно активних сполук

Протягом десятиліть відкриття нових природних сполук досягалось шляхом аналізу їхньої біологічної активності. Оскільки біологічна активність була основою для виділення сполуки, такий спосіб мав значний успіх в їх ідентифікації. Проте, цей підхід скринінгу є доволі трудомістким та може займати неймовірно багато часу. Крім того, такий нецільовий підхід і часто призводив до повторного виділення вже відомої сполуки [96].

З появою першої повної геномної послідовності модельного штаму актиноміцетів *S. coelicolor* A3 (2) [20], опублікованої в 2002 році, стало зрозуміло як мало насправді, відомо про його вторинний метаболізм. На той час знали, що *S. coelicolor* продукує актинородин, метиленоміцин, кальційзалежний антибіотик і ундецилпродігіозин [163]. Зі збільшенням кількості секвенованих мікробних геномів, стало очевидним, що ці геноми кодують велику кількість кластерів генів біосинтезу вторинних метаболітів. Водночас, вони мають потенціал продукувати значно більше природних сполук, ніж ті, які були виділені шляхом звичайної ферментації. Співставлення відомих природних сполук із кластерами генів біосинтезу дозволило визначити гени їхнього синтезу. Отримана інформація стала основою для розробки інструментів прогнозування кластерів генів біосинтезу вторинних метаболітів, таких як antiSMASH [24] і PRISM [199], а також для

створення баз даних генних кластерів, таких як MiBiG [97]. Використання цих інструментів дозволяє оцінити потенціал мікроорганізмів до продукування вторинних метаболітів, використовуючи лише нуклеотидні послідовності їхнього геному. Це дає змогу оцінити спектр кластерів генів біосинтезу вторинних метаболітів та сформувавши перелік потенційно нових кластерів для подальшого дослідження [66]. Однак, такий спосіб скринінгу не дає можливості визначити тип біологічної активності сполуки. Водночас, це можна передбачити присутністю в кластері специфічних генів. Зокрема, генів, які відповідають за формування певних функціональних груп сполуки з електрофільною, радикальною або нуклеофільною реакційною здатністю, які часто призводять до ковалентного зв'язування ліганду з білком-мішенню. Або ж генів, наявність яких впливає на структурні особливості, важливі для здатності природної сполуки нековалентно зв'язуватися з біологічною або хімічною мішенню [16]. Яскравим прикладом виступають гени β -лактам-синтез, які відповідають за утворення β -лактамного кільця [40]. Ці електрофільні функціональні групи реагують з нуклеофілами через реакції відкриття кільця та ковалентно зв'язуються з біологічною мішенню [177]. Таким чином, присутність генів β -лактам-синтез у кластерах генів біосинтезу може вказувати на наявність β -лактамного кільця в потенційній сполуці, кодованій цим кластером генів.

Виділення біологічно активних сполук можна досягти шляхом пошуку кластерів генів із спільними біосинтетичними характеристиками, але з відмінностями, достатніми для утворення нових структур. Такий підхід може забезпечити виявлення нового члена уже відомої родини природних сполук. При цьому, біосинтетичні гени, що відповідають за загальну хімічну будову сполуки, використовують, як “гачки” для виявлення споріднених аналогів. Такими “гачками” для скринінгу можуть бути окремі гени, невеликі генні касети чи навіть цілі кластери [16]. Внаслідок ідентифікації рифаміцин-подібних кластерів генів біосинтезу, що містять додаткові гени, виявили нові антибіотики цього класу – канглеміцини, які продемонстрували новий механізм дії та оминають наявні механізми стійкості до рифампіцину. Зокрема, вони впливають на активність

ДНК-залежної РНК-полімерази, інгібуючи утворення як повнорозмірного транскрипту, так і абортивних продуктів. Таким чином, канглеміцини інгібують транскрипцію на крок раніше, ніж рифампіцин [161].

Скринінг кластерів генів біосинтезу потенційно нових сполук за генами стійкості до власного продукту також має високий рівень ефективності. Цей підхід ґрунтується на тому, що кластери генів біосинтезу антибіотиків зазвичай містять гени стійкості до власного токсичного продукту. Мікроорганізми зазвичай використовують три основні стратегії для уникнення самотоксичності, а саме: 1) детоксикація сполуки, 2) зв'язування й видалення сполуки через транспортні шляхи, та 3) цільова дуплікація/модифікація, коли організм кодує продубльовану, але стійку копію гена-мішені [153]. Направлений скринінг біосинтетичних кластерів із генами резистентності, збільшує ймовірність того, що закодована сполука може бути антибіотиком. Використання цього підходу привело до ідентифікації інгібітора синтази жирних кислот тіолактоміцином та тіотетронової кислоти [212].

Таким чином, завдяки великій кількості доступних біоінформатичних інструментів сьогодні відносно просто ідентифікувати новий імовірний кластер генів природної сполуки *in silico*. Однак, виклик полягає в експериментальному підтвердженні наявності кластера, його експресуванні і, зрештою, нагромадження достатньої кількості й визначенні хімічної будови цільового продукту. Для цього розроблено різноманітні підходи, такі як гетерологічна експресія в штамі-господарі, маніпулювання з регуляторними генами, оптимізація умов вирощування продуцента.

Стрімкий розвиток та поширення резистому у патогенних мікроорганізмів вказує на постійну нестачу антимікробних препаратів для запобігання цьому. В останні роки стратегія виявлення природних сполук серед актиноміцетів змінилася та включає дослідження актиноміцетів, виділених з незвичайних екосистем, рідкісних родів та активування “мовчазних” кластерів генів біосинтезу. Крім того, зі значним розвитком секвенування геномів виявили, що актиноміцети мають прихований біосинтетичний потенціал до продукції десятків

вторинних метаболітів. Оскільки, актиноміцети все ще є потужним джерелом природних сполук із інтригуючою біологічною активністю, важливим є виділення та вивчення біосинтетичного потенціалу нових ізолятів з недосліджених біотопів, так як вони можуть бути продуцентами нових біологічно активних речовин.

Дослідження, представлені в цій роботі, присвячені вивченню актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* з мало вивченого біотопу (Кримський півострів), як джерела різноманіття актиноміцетів та їхнього потенціалу до продукування біологічно активних речовин, зокрема нових.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень

2.1.1. Штами мікроорганізмів

Ізоляти актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*, їхні депозитарні номери в базі даних GenBank та біосинтетичні характеристики наведені в Додатку Б (Таблиця Б.1), усі інші мікроорганізми використані в роботі наведені в Додатку Б (Таблиця Б.2). Використані у роботі штами мікроорганізмів зберігаються в ККМПА.

2.2.2. Середовища та умови культивування

Склад усіх середовищ, використаних у роботі, наведено в Додатку В.

Для дослідження культурально-морфологічних особливостей та мікроскопії ізолятів використовували агаризовані середовища ISP2 та ISP3.

Для виділення хромосомної ДНК та одержання попередньої культури, ізоляти актиноміцетів культивували в рідкому середовищі TSB (HiMedia).

Для вивчення ангітаногістичних властивостей ізоляти актиноміцетів вирощували на модифікованому середовищі ISP3.

Штами тест-культур бактерій вирощували на середовищі LB, штами тест-культур грибів вирощували на середовищі Сабуро.

Для виявлення здатності ізолятів актиноміцетів покращувати ріст рослин використали середовище YEM для визначення синтезу сидерофорів, середовище Муромцева для визначення здатності солюбілізувати нерозчинні форми Фосфору, середовище SG з додаванням 2% триптофану для визначення синтезу ІОК та середовище N-free для визначення фіксації атмосферного азоту.

Для скринінгу продуцентів антибіотиків, використовуючи мікробні біосенсори, ізоляти актиноміцетів вирощували на середовищі ISP3. Скринінг продуцентів тіопептидних антибіотиків, антибіотиків-інгібіторів синтезу пептидоглікану та памаміцинів здійснювали на середовищі Беннета з додаванням 50 мкг/мл канаміцину, 50 мкг/мл 5-бром-4-хлор-3-індоліл- β -D-галактозиду (X-gal)

та 50 мкг/мл 5-бромо-4-хлоро-1H-індол-3-іл β -D-глюкопіранозидурунової кислоти (X-gluc), відповідно.

Для отримання екстрактів вторинних метаболітів ізоляти актиноміцетів культивували в рідких середовищах SG, DNPM та SGG.

Типові штами, природні ізоляти актиноміцетів та тест-культури грибів вирощували при температурі 28-30 °C, тест-культури бактерій – 37 °C.

2.1.3. Реактиви

Компоненти поживних середовищ, які використовували в роботі перелічені в додатку В.

У роботі використовували антибіотики: гентаміцин (Артеріум), новобіоцин (Sigma-Aldrich) та авіламіцином (Cayman Chemicals), налідиксову кислоту (Sigma-Aldrich), ністатин (Sigma-Aldrich), канаміцину сульфат (Sigma-Aldrich), циклогексамід (Sigma-Aldrich). Усі антибіотики розчиняли у воді, ністатин та налідиксова кислота потребували підлучення для кращого розчинення.

Для виділення та аналізу ДНК використовували трис (гідроксиметил) амінометана (Трис) (Promega), етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА) (Promega), додецилсульфат натрію (ДСН) (Merck), NaCl (СфераСім), CH_3COOK (СфераСім), CH_3COOH (СфераСім), етанол (Sigma-Aldrich), ізопропанол (СфераСім), агарозу (AppliChem), бромистий етидій (Roth), хлоридну кислоту (СфераСім), триптофан (СфераСім)

Для екстракції та очистки вторинних метаболітів використовували метанол (Fisher Scientific), етилацетат (Fisher Scientific), ацетон (Fisher Scientific), гексан (Fisher Scientific), хлороформ (Fisher Scientific), ацетонітрил (Fisher Scientific), мурашину кислоту (Carl Roth).

2.1.4. Праймери

Перелік нуклеотидних послідовностей праймерів, використаних в роботі, наведено в Додатку Г.

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Визначення антимікробної активності ізолятів

Ізоляти актиноміцетів по шість штук висівали уколом по периметру чашки Петрі з середовищем ISP3 та інкубували при 28 °С протягом шести днів.

За день до експерименту тест-культури висівали в 15 мл відповідного рідкого середовища та інкубували в належних умовах зі швидкістю струшування 180 об/хв протягом ночі. Нічну культуру відповідної тест-культури вносили в напіврідкий агар. Далі, на шостий день росту актиноміцетів, чашки Петрі покривали 5 мл напіврідкого LB (для бактерій) чи середовища Сабуро (для грибів) агару із відповідною тест-культурою.

Скринінг здійснювали використовуючи такі тест-культури: фітопатогенних бактерій (*Pseudomonas syringae* IMB 8511, *P. fluorescens* IMB 8573, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* IMB 4012, *Pectobacterium carotovorum* IMB 8982, *Xantomonas campestris* pv. *campestris* IMB8003, *Agrobacterium tumifaciens* IMB 8628 та *Erwinia amylovora* Mi2), фітопатогенних грибів (*Fusarium oxysporum* IMB 54201, *Botrytis cinerea* IMB 2306, *Aspergillus niger* IMB 16706 та *Alternaria alternata* DSM 1102) та умовно-патогенних мікроорганізмів (*Bacillus subtilis* ATCC 31324, *S. aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus vulgaris* ATCC 29905, *Candida albicans* ATCC 885-653).

Антимікробну активність визначали за появою зон пригнічення росту тест-культур. Індекс антимікробної активності (ІАА) визначали відношенням діаметру зони пригнічення росту до діаметру колонії:

$$\text{ІАА} = \frac{\text{діаметр зони пригнічення (мм)}}{\text{діаметр колонії (мм)}}$$

ІАА групували у три категорії: < 3 (низький), 3–6 (середній) і > 6 (високий).

2.2.2. Виділення сумарної ДНК з актиноміцетів

Виділення сумарної ДНК здійснювали, використовуючи стандартний протокол. Для цього осаджену біомасу актиноміцетів ресуспендували в 450 мкл буферу (25мМ трис-НСl, 25 мМ ЕДТА, рН 8,0) із додаванням 4 мг/мл лізоциму та інкубували протягом 30 хв при 37 °С. Далі, до лізату клітин додавали 50 мкл 5 М NaCl та 120 мкл 10% ДСН, обережно перемішували шляхом обертання пробірки та інкубували протягом 30 хв при 65 °С. Після інкубування пробірки охолоджували до кімнатної температури та додавали 240 мкл 5 М CH₃COOK, щоб висолити білки. Пробірки витримували протягом 20 хв при -20 °С. Далі вміст пробірки осаджували, відділяли супернатант та преципітували ДНК використовуючи ізопропанол. Для промивання використовували 70% етанол. Висушування ДНК здійснювали за температури 37 °С та розчиняли у воді [262].

2.2.3. Визначення потенційної фітостимулювальної здатності ізолятів

Синтез сидерофорів. Визначення здатності ізолятів продукувати сидерофори здійснювали використовуючи модифікований метод O-CAS. Досліджувані ізоляти актиноміцетів інокулювали по сім ізолятів на чашку з середовищем YEM по периметру та вирощували при 28 °С протягом семи діб. На сьому добу росту актиноміцетів чашки заливаються 2 мл CAS-індикаторним розчином (хром азурол S, Carl Roth) та інкубували протягом 2-4 години при кімнатній температурі. Навколо ізолятів, які продукували сидерофори, утворювався ореол жовтого, оранжевого чи малинового кольору, які вказували на продукцію сидерофорів.

Солюбілізація нерозчинних форм Фосфору. Для визначення здатності солюбілізувати нерозчинні форми фосфору ізоляти актиноміцетів вирощували при 28 °С протягом 7 діб на середовищі Муромцева. Ізоляти, які здатні солюбілізувати Фосфор, утворювали прозору зону навколо колоній.

Синтез індоліл-3-оцтової кислоти. Для вивчення синтезу ІОК ізоляти актиноміцетів інокулювали в 10 мл середовища TSB та вирощували впродовж 2 діб при 28 °С та 180 об/хв. 1 мл попередньої культури ізолятів інокулювали в 50

мл середовища SG з 0,2 % триптофану, вирощували протягом 5 діб при 28 °С та 180 об/хв. Відбирали 1 мл, осаджували центрифугуванням протягом 3 хв при 13 тис.об/хв. 100 мкл надосадової рідини, переносили в нові пробірки і додавали 100 мкл реактиву Сальковського (0.01 М FeCl₃ в 35% HClO₄). Інкубували протягом 30 хв в темряві. Про присутність в культуральній рідині ІОК вказувала зміна кольору суміші з жовтого до рожевого. Як контроль використали 0,1% розчин гетероауксину (СфераСім).

Фіксація атмосферного азоту. Для визначення здатності фіксувати атмосферний азот ізоляти актиноміцетів засівали секторами (1x1 см) зубочисткою на середовище N-free. Вирощували при 28 °С протягом 7 діб. Присутність росту штаму вказував на його здатність до фіксації атмосферного азоту.

2.2.4. Електрофоретичне розділення ДНК в агарозному гелі

Електрофоретичне розділення ДНК здійснювали в горизонтальному агарозному гелі з концентрацією агарози 0,7 – 1,0%, залежно від потреби. ДНК розділяли при напрузі 80-130 В в однократному трис-ацетатному буфері (ТАЕ: 40 мМ трис-НСІ, 1 мМ Na₂ЕДТА, 20 мМ СН₃COONa, 25 мМ СН₃COOH). Для встановлення розміру фрагменту, як маркер використовували GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Для візуалізації фрагментів ДНК до гелю додавали етидій бромід у концентрації 2 мкг/мл або витримували гель у водяній бані із доданим барвником протягом 15 хв. ДНК-фрагменти виявляли за допомогою УФ-транслюмінатора (Biometra ТП1).

2.2.5. Приготування сумарної ДНК до геномного секвенування

Сумарну ДНК обробляли рибонуклеазою (РНКаза) у концентрації 2-4 мкг/мл та інкубували при 37 °С протягом 2-4 год. Після інкубації з РНКазою, додавали 1/10 об'єму 5М NaCl та 3М ацетату натрію. ДНК переосаджували в абсолютному етанолі. Якість ДНК перевіряли електрофоретично, використовуючи апарат для електрофорезу POWER Pro (Clever) та

спектрофотометрично за допомогою DeNovix DS-11⁺, використовуючи коефіцієнт поглинання: $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ (ДНК/солі) і $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (ДНК/білок).

2.2.6. Полімеразна ланцюгова реакція

Для ампліфікації бажаних фрагментів ДНК використовували полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). ПЛР проводили на ампліфікаторі Pro Flex PCR system в загальному об'ємі 50 мкл використовуючи полімерази Phusion та Taq (ThermoFisher Scientific, NEB). До складу реакційної суміші входили: 36,5 мкл H₂O, 5 мкл 10X буферу для ПЛР, 1 мкл кожного праймера (100 пМоль), 1 мкл суміші дезоксинуклеозидтрифосфатів (10 мМоль кожен), 2,5 мкл диметилсульфоксиду та 3 мкл ДНК матриці (~50-100 нг). Умови ампліфікації підбирали залежно від рекомендацій виробників та складу праймерів.

2.2.7. Елюювання фрагментів ДНК із агарозного гелю

Після електрофоретичного розділення, зафарбовані фракції ДНК потрібного розміру вирізали під УФ-лампю й переносили в мікропробірки типу Eppendorf. ДНК із цього фрагменту виділяли, використовуючи набір QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) згідно інструкції, елюювали у 50 мкл дистильованої води й зберігали при -20 °С.

2.2.8. Секвенування ампліфікованих фрагментів ДНК

Секвенування ампліфікованих фрагментів ДНК здійснювали для визначення їхньої нуклеотидної послідовності. Елюйовані амплікони об'ємом 5 мкл, концентрація яких становила 20-80 нг/мл, змішували окремо із форвардним та реверсним праймерами (5 пМоль), які використовували для ампліфікації. Секвенування здійснювали за Сенджером в компанії GENEWIZ from Azenta Life Sciences (Південний Плейнфілд, Нью-Джерсі, США). Пряму та зворотну послідовності збирали за допомогою програмного забезпечення Geneious версії 9.1.2 [101].

2.2.9. Таксономічний аналіз та філогенія ізолятів актиноміцетів

Таксономічний аналіз ізолятів актиноміцетів здійснювали на основі нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК з допомогою онлайн ресурсу Ribosomal Database Project Release 11 (<https://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). Філогенетичний аналіз здійснювали, використовуючи послідовності генів 16S рРНК ізольованих актиноміцетів та їхніх найспорідненіших видів. Пошук найспорідненіших видів серед актиноміцетів здійснювали, використовуючи програму Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) бази даних National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Філогенетичне дерево будували з використанням алгоритму з'єднання сусідів [180], розробленого на 2-параметровій моделі Кімури [104] в програмі Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) версія X [110]. Достовірність топології філогенетичного дерева оцінювали за допомогою бутстреп-тесту в 1000 повторів.

2.2.10. Мультилокусний аналіз

Для отримання вищої роздільної здатності філогенетичних зв'язків видів у межах роду використовували метод мультилокусного аналізу послідовностей. Для цього використовували нуклеотидні послідовності генів “домашнього господарювання”, такі як АТФ-синтаза бета субодиниця (*atpD*), ДНК-гіраза В субодиниця (*gyrB*), рекомбіназа А (*recA*), РНК-полімераза В субодиниця (*rpoB*) і триптофан-синтаза В субодиниця (*trpB*). Ампліфікацію цих генів здійснювали з використанням специфічних праймерів, як описано раніше [73].

Отримані послідовності генів “домашнього господарювання” коригували таким чином: *atpD* - 496, *gyrB* - 441, *recA* - 504, *rpoB* - 540 та *trpB* - 567 пар нуклеотидів (п.н.). Далі ці нуклеотидні послідовності об'єднували у штучну послідовність, яка була створена в такому порядку *atpD-gyrB-recA-rpoB-trpB*. Отримані таким чином з'єднані послідовності вирівнювали та аналізували.

2.2.11. Скринінг продуцентів тіопептидних антибіотиків

Скринінг продуцентів тіопептидних антибіотиків здійснювали, використовуючи штам-біосенсор *S. lividans* TK24 рМО16 з інтегративною плазмідною рМО16, в якій експресія гена резистентності до неоміцину/канаміцину (*neo*) знаходиться під контролем тіострептон-індуцибельного промотора (*tipAp*) [146]. Штам-біосенсор вирощували на модифікованому середовищі ISP3 протягом семи діб. Суспензію спор штаму-біосенсора отримували шляхом змиву з агарової поверхні фізіологічним розчином (0,9% хлориду натрію). Далі 100 мкл десятикратного розведення (10^{-1}) суспензії спор висівали на агаризоване середовище Беннетта з 50 мкг/мл канаміцину. Після цього, агарові блоки досліджуваних ізолятів актиноміцетів вирізали з газонів, вирощених на середовищі ISP3 протягом семи діб, і викладали на агар зі свіжо висіяним штамом-біосенсором. Інкубували протягом п'яти-семи діб при 28°C. Поява росту штаму-біосенсора навколо агарових блоків вказувала на продукцію тіопептидів. Штами *S. siyoaensis* NRRL-B5408 (продуцент сіоміцину) і *S. coelicolor* M145 (не виробляє тіопептидних антибіотиків) використовували, як позитивний і негативний контролю, відповідно.

2.2.12. Скринінг продуцентів памаміцинів

Скринінг продуцентів памаміцинів здійснювали з використанням штаму-біосенсора *S. albus* ΔpseB4 CD10RO1, який містить ген *gusA*, клонований замість гена *patW* під контролем синтетичного промотора D10 [174]. Ізоляти актиноміцетів і штам-біосенсор вирощували одночасно на різних чашках Петрі з модифікованим середовищем ISP3 протягом семи діб. На підготовлені за добу до експерименту чашки Петрі з середовищем Беннета з 5-бромо-4-хлоро-1Н-індол-3-іл β-D-глюкопіранозидуроною кислотою (X-gluc, 50 мкг/мл) висівали 100 мкл десятикратного розведення (10^{-1}) суспензії спор штаму-біосенсора. Із газонів досліджуваних ізолятів вирізали агарові блоки та з допомогою стерильної зубочистки переносили їх на чашки із вже засіяним штамом-біосенсором. Виявлення продукції памаміцинів здійснювали на третій-четвертий день росту

при температурі 28 °С. Поява синього ореолу навколо агарового блоку свідчила про ймовірну продукцію памаміцинів.

2.2.13. Скринінг продуцентів антибіотиків-інгібіторів синтезу пептидоглікану

Для пошуку продуцентів антибіотиків-інгібіторів синтезу пептидоглікану використовували штам-біосенсор *B. subtilis* HB0950, який виробляє β -галактозидазу у відповідь на індукцію *liaIp* відповідними антибіотиками [48]. Ізоляти актиноміцетів вирощували на чашках із модифікованим середовищем ISP3 протягом семи діб. Перед експериментом висівали нічну культуру штаму-біосенсора в 10 мл середовища LB та інкубували при 37 °С через ніч. У день експерименту нічну культуру штаму-біосенсора (100 мкл) висівали в нові колби і культивували протягом трьох-чотирьох годин до отримання $OD_{600} = 0,25$. Значення OD вимірювали на спектрофотометрі ULAB 102. Із газонів ізолятів вирізали агарові блоки та переносили на чашки з середовищем Беннета з X-gal (50 мкг/мл). Далі, 1 мл підготовленої культури штаму-біосенсора вносили в 50 мл напіврідкого LB із X-gal (50 мкг/мл) та покривали чашки з агаровими блоками в розрахунку 5 мл/чашка. Чашки культивували при 37 °С протягом 16-20 годин. Поява синього ореолу у сублетальній зоні пригнічення росту штаму-біосенсору свідчила про ймовірний синтез антибіотиків-інгібіторів синтезу пептидоглікану.

2.2.14. Екстракція та аналіз вторинних метаболітів

Для екстрагування вторинних метаболітів ізоляти актиноміцетів культивували у середовищі SG. Для отримання попередньої культури ізоляти вирощували в 15 мл середовища TSB у колбах об'ємом 100 мл протягом 2 днів при 28 °С і 180 об/хв у шейкері Infors multitron (Infors AG, Базель, Швейцарія), далі 1 мл попередньої культури інокулювали у 100 мл середовища SG у колбах об'ємом 500 мл. Культури актиноміцетів вирощували протягом 7 днів при 28 °С і 180 об/хв. Вторинні метаболіти екстрагували окремо з культуральної рідини рівним об'ємом етилацетату та сумішню ацетону:метанолу (1:1) з біомаси.

Отримані екстракти випарювали на роторному випарювачі ІКА RV-8 (ІКА, Німеччина) при 40 °С і перерозчиняли в метанолі. Екстракти аналізували на системі Dionex Ultimate 3000 UPLC (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, США) з'єднаній з детектором PDA, використовуючи 100 мм колонку ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм (Waters Corporation, Milford, MA, США). Воду з 0,1% (об./об.) мурашиної кислоти (розчинник А) і ацетонітрил з 0,1% (об./об.) мурашиної кислоти (розчинник Б) використовували як рухому фазу. Розділення екстрактів здійснювали в лінійному градієнті від 5 до 95% розчинника Б при швидкості потоку 0,6 мл/хв протягом 18 хв за температури 40 °С. Мас-аналіз проводили на мас-спектрометрі Bruker Amazon Speed (Bruker, Billerica, MA, USA) з використанням позитивного режиму іонізації та діапазону виявлення m/z 150–2000 Да. Дані аналізували за допомогою Compass Data Analysis v. 4.2 (Bruker, Billerica, MA, США).

2.2.15. Дереплікація вторинних метаболітів

Для дереплікації вторинних метаболітів в екстрактах ізолятів використовували базу даних словника природних сполук (англ. Dictionary of Natural Products (DNP)) версії 10.0 [28] за такими параметрами: точна молекулярна маса, спектри поглинання, аналіз фрагментації та біологічне джерело [179]. Сполуки вважали подібними, якщо різниця в точних масах була менша, ніж 5 ppm, а спектри поглинання, фрагментація та джерело виділення були ідентичними.

2.2.16. Екстракція та очищення фурахіноцинів K і L

Для отримання вторинних метаболітів ізолят *Streptomyces* sp. Je 1-369 вирощували в 10 л середовища SG та екстрагували з культуральної рідини, використовуючи етилацетат. Отриманий етилацетатний екстракт випарювали та концентрували з використанням метанолу. Фурахіноцини очищали в три етапи.

Першим етапом очищення була нормально-фазова хроматографія на колонці з силікагелем, як рухому фазу використовували гексан (розчинник А),

хлороформ (розчинник В), етилацетат (розчинник С) і метанол (розчинник D), при швидкості потоку 100 мл/хв. Використовували потрійний лінійний градієнт кожної пари розчинників А/Б (10 об'ємів колонки (ОК)), Б/В (15 ОК) і В/Г (15 ОК), фракції збирали кожні 18 мл. Розділення виконували на системі Biotage Isolera One LC-system (Biotage, Упсала, Швеція) з використанням колонки SNAP Ultra 50g HP-Sphere (Biotage, Упсала, Швеція). Використовуючи ВЕРХ-МС у відібраних фракціях шукали фурахіноцини. Фракції, що містили фурахіноцини, об'єднували та концентрували.

Другим етапом очищення була ексклюзивна хроматографія на колонці довжиною 1 м, заповненій Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA) з метанолом, як рухомою фазою, при швидкості потоку 1 мл/хв. Аналіз фракцій та відбір тих, які містили фурахіноцини здійснювали як у першому етапі.

Останнім етапом очищення була обернено-фазова ВЕРХ. Розділення здійснювали на напівпрепаративній С18 колонці Synergi™ 4 мкм Fusion-RP 80 Å 250×10 (Phenomenex, Torrance, CA, США) з використанням як рухомої фази води, що містить 0,1% (об./об.) мурашиної кислоти (розчинник А) і розчин ацетонітрилу, що містить 0,1% (об./об.) мурашиної кислоти (розчинник Б), при швидкості потоку 4 мл/хв. При цьому, використовували наступний градієнт для розділення сполуки **1**: 0 хв – 35% Б, 0,5 хв – 35% Б, 2,5 хв – 70% Б, 17,5 хв – 95% Б, 21 хв – 95% Б, 22 хв – 35 %Б і 23 хв – 35 % Б. Для розділення сполуки **2** використовували наступний градієнт: 0 хв – 35 % Б, 0,5 хв – 35 % Б, 2,5 хв – 50% Б, 17,5 хв – 95% Б, 21 хв – 95% Б, 22 хв – 35% Б і 25 хв – 35% Б. Фракції, що містили чисті сполуки, об'єднували та випарювали.

2.2.17. Ядерно-магнітний резонанс

Для визначення структурних формул фурахіноцинів К та L використовували ядерно-магнітний резонанс (ЯМР). Спектри ЯМР фурахіноцину К вимірювали на Bruker Avance I UltraShield 500 МГц (Bruker, BioSpin GmbH, Rheinstetten, Німеччина), обладнаному 5-мм зондом ВВО при 298 К. Спектри ЯМР фурахіноцину L вимірювали на Bruker Avance III Спектрометр Ascent 700

МГц при 298 К, оснащений криозондом TCI 5 мм. Хімічні зсуви (δ) були представлені в частках на мільйон (ppm) відносно TMS. Як розчинники використовували CDCl_3 (δ H 7,27 ppm, δ C 77,00 ppm) та ДМСО-d 6 (δ H 2,50 ppm, δ C 39,51 ppm, 1 крапля TFA (Deutero, Kastellaun, Німеччина)). Спектри відредагваної поляризації посилені без спотворень (англ. Distortionless Enhancement by Polarization Transfer DEPT- edited) ^1H , ^{13}C -HSQC, ^1H , ^{13}C -HMBC, ^1H - ^1H COSY, ^1H , ^{15}N -HSQC і ^1H , ^{15}N -HMBC вимірювали з допомогою стандартних імпульсних програм із TOPSPIN v.3.6.

2.2.18. Визначення мінімальної інгібувальної концентрації фурахіноцинів K і L

Мінімальні інгібувальні концентрації (МІК) фурахіноцинів визначали за стандартним протоколом. Окремі колонії мікробних тест-культур вирощували в рідкому середовищі LB та розводили для отримання кінцевого інокуляту 10^4 колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл. Паралельно готували серійні розведення фурахіноцинів в концентрації від 0,5 до 64 мкг/мл, використовуючи метанол як розчинник. Визначення МІК здійснювали в стерильних 96-лункових планшетах. До лунки, яка містила 10 мкл відповідної концентрації фурахіноцинів, вносили 190 мкл тест-культури. Інкубували протягом 16-18 год при температурі 37 °С. Після вирощування додавали 5 мкл тіазоліл синій тетразолію броміду (МТТ, 10 мкг/мл) та інкубували при 30 °С протягом 1 год. МІК оцінювали візуально, як концентрацію фурахіноцинів в лунці, в якій колір сполуки не змінювався від жовтого до темно-синього. Для визначення МІК використовували наступні тест-культури: *B. subtilis* DSM 10, *S. aureus* Newman, *Mycobacterium smegmatis* mc2155, *E. coli* BW25113, *E. coli* Δ acrB JW0451-2, *P. aeruginosa* PA14, *A. baumannii* DSM 30008, *Citrobacter freundii* DSM 30039, *C. albicans* DSM 1665, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* DSM 11959, *Pichia anomala* DSM 6766 та *Mucor hiemalis* DSM 2656.

2.2.19. Визначення цитотоксичності фурахіноцинів K і L

Для оцінки цитотоксичної активності фурахіноцинів використовували лінію клітин раку печінки людини HepG2, отриману з Німецької колекції мікроорганізмів і клітинних культур (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)) й культивовану в умовах, рекомендованих депозитором. Клітини вирощували та розводили до 5×10^4 клітин на лунку у 96-лункових планшетках, в об'ємі 180 мкл повноцінного середовища RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) доповненого 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби. Після 2 год калібрування ($37\text{ }^\circ\text{C}$ і 5% CO_2) клітини обробляли серійними розведенням фурахіноцинів (починаючи з концентрації 37 мкг/мл) у метанолі. Клітини обробляли протягом 5 днів. Далі 20 мкл МТТ (5 мг/мл) у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) додавали до кожної лунки, інкубували протягом 2 год при $37\text{ }^\circ\text{C}$ перед видаленням супернатанту. Після інкубування, клітини осаджували та промивали 100 мкл ФСБ і обробляли 100 мкл розчином 2-пропанол/10N HCl (250:1) для розчинення гранул формазану. Життєздатність клітин вимірювали у відсотках відносно відповідного метанольного контролю, шляхом вимірювання поглинання при 570 нм, використовуючи зчитувач для мікропланшетів (Tecan Infinite 200 PRO). GraphPad Prism використовували для підгонки сигмоїдальної кривої для визначення значень концентрації напівмаксимального інгібування (IC50), а також для розрахунку довірчих інтервалів.

2.2.20. Біоінформатичний аналіз

Аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей геномів, секвенованих фрагментів, а також підбір праймерів здійснювали, використовуючи Geneious 9.1.2 [101]. Пошук кластерів генів вторинних метаболітів та їхній аналіз здійснювали з допомогою інструменту аналізу геному antiSMASH [24]. Для створення структурних формул хімічних сполук використовували ChemDraw Ultra 12.0 (CambridgeSoft).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Різноманіття та антимікробна активність актиноміцетів ризосфери

J. excelsa

Територія України лежить переважно в помірно-континентальній зоні помірного кліматичного поясу з великим різноманіттям природних зон: північно-західний регіон зі значними лісовими масивами та великим різноманіттям флори, південно-східний посушливіший регіон зі степовим та напівпустельним ландшафтами та, відповідно, біднішою рослинністю, Карпатські та Кримські гірські масиви, прибережні зони Чорного та Азовського морів тощо. В окремих, з кліматичної точки зору, регіон виділяють Південний берег Криму (ПБК), для якого характерний субтропічний середземноморський клімат. Такий широкий діапазон кліматичних умов, включаючи різноманіття типів ґрунтів, сприяє значному рослинному біорізноманіттю, в т.ч. ризосферної мікробіоти. Однак спільнота ґрунтових мікроорганізмів, зокрема актиноміцетів, в українських біотопах досліджена недостатньо.

Клас *Actinomycetia*, різноманітна група грампозитивних бактерій, які широко розповсюджені в різних середовищах існування [211]. Відомо, що різноманіття видового складу ґрунтових актиноміцетів значно розширюється при переході від північних до південних широт [39]. Тому ПБК може характеризуватися надзвичайно великим мікробним різноманіттям порівняно з іншими біотопами України.

Особливістю актиноміцетів, яка привертає увагу дослідників, є їхня здатність продукувати біологічно активні сполуки антибіотичної природи. Потенційно велике різноманіття актиноміцетів ПБК може визначати широкий спектр природних біологічно активних сполук. Типовою рослиною цього регіону є ялівець високий, який за даними Червоної книги України віднесений до вразливих видів [263]. Наш інтерес до ризосферних актиноміцетів *J. excelsa* зумовлений лікарськими властивостями рослин цього виду, препарати на їх основі використовували у традиційній перській медицині [183]. Екстракти з різних частин ялівцю високого містять велику кількість метаболітів з

антибактерійною, протигрибковою, протипаразитарною та іншими активностями [7; 141].

Філогенетична характеристика та дослідження біологічних властивостей актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* дозволить з'ясувати їхнє різноманіття та біосинтетичний потенціал, а також оцінити перспективність розвитку досліджень мікробіоти Кримського півострова.

3.1.1. Філогенія актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*

Використані в роботі актиноміцетні ізоляти були виділені зі зразків ґрунту прикореневої зони рослини ялівцю високого, що росте біля підніжжя гори Кішка (Global Positioning System (GPS) coordinates: N 44°24'02.07" E 33°59'32.96"; Кримський півострів, Україна) к.б.н., старшим дослідником Громиком О.М. у 2008 році. Для виділення актиноміцетів було використано три різні методи: I) прямий посів водних суспензій ґрунту; II) обробка ґрунту 1,5% водним розчином фенолу; III) прогрівання ґрунту при 100 °С. Далі отриманні суспензії висівали на сім різних за складом поживних середовищ, а саме: ISP3, ISP4, HVA, ATCC172, Гаузе 2, Хітинове середовище та з пропіонатом натрію [249; 261].

Виділені таким чином 372 ізоляти сформували колекцію актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* та були задепоновані в ККМПА Львівського національного університету імені Івана Франка (рис. 3.1.).



Рис. 3.1. Ріст окремих ізолятів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* на модифікованому середовищі ISP3.

Таксономічне положення актиноміцетних ізолятів ризосфери *J. excelsa* визначали за аналізом нуклеотидних послідовностей генів 16S рРНК. Для цього з ізолятів виділяли сумарну ДНК та ампліфіковали ділянку гена 16S рРНК за допомогою універсальних праймерів 8F та 1510R. Якщо секвеновані ділянки, отримані з ампліконів, не перекривались, їх додатково ампліфікували іншою парою праймерів 510F і 1371R та секвенували (рис. 3.2.). Отримані цілісні фрагменти ділянки гена 16S рРНК аналізували, використовуючи інструмент Classifier для таксономічної класифікації бактерій в онлайн ресурсі “The Ribosomal Database Project (RDP)” (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Нуклеотидні послідовності генів 16S рРНК ізолятів задепоновані в базі даних генетичної інформації GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), де їм присвоєні ідентифікаційні номери (Додаток Б, табл. Б1).



Рис. 3.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації генів 16S рРНК деяких ізолятів актиноміцетів з використанням різних пар праймерів (8F/1510R та 510F/1371R).

На основі таксономічного аналізу усі ізоляти були ідентифіковані, як представники класу *Actinomycetia* та представлені сімома родинями (*Kribbellaceae*, *Micrococcaceae*, *Micromonosporaceae*, *Nocardiaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Pseudonocardiaceae* та *Streptomycetaceae*) й одинадцятьма родами (*Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora* та *Streptomyces*). Найбільша кількість ізолятів, 350 або 94% від усіх, належали до

роду *Streptomyces*. Це не дивно, оскільки представникам цього роду властиве значне поширення в наземних екосистемах [70]. Далі за кількістю ізолятів були роди *Micromonospora* (8 ізолятів), *Amycolatopsis* та *Promicromonospora* (по 3 ізоляти), *Nocardia* (2 ізоляти). Такі роди, як *Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Kribbella*, *Micrococcus*, *Rhodococcus* та *Saccharopolyspora* були представлені лише по 1 ізоляту (рис. 3.3.).

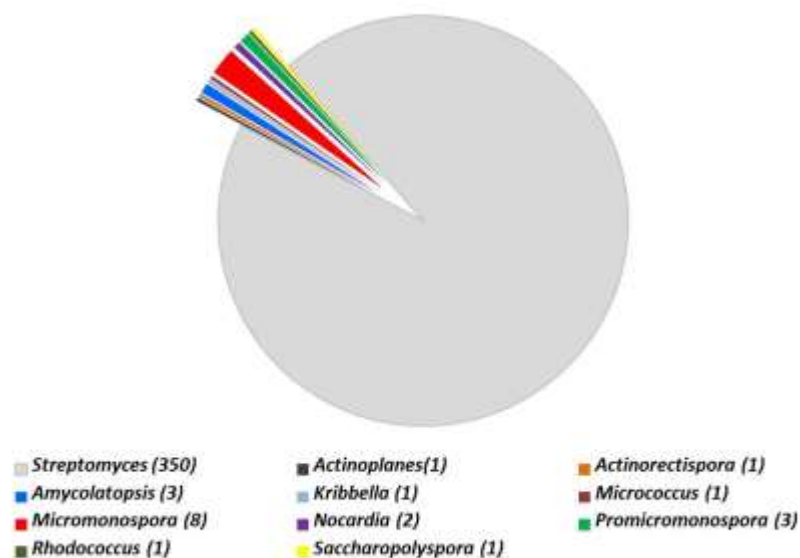


Рис. 3.3. Співвідношення родів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* (в дужках вказано кількість ізолятів роду).

Під час наступного етапу роботи, ми виконали порівняльний аналіз філогенетичного різноманіття ізолятів залежно від використаних методів виділення (рис. 3.4.). Метод I дав змогу виділити найбільшу кількість ізолятів, серед яких були представники шести родів актиноміцетів, такі як: *Amycolatopsis*, *Promicromonospora*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Rhodococcus* та *Streptomyces*. Застосування Методу III, також привело до виділення шести актиноміцетних родів (*Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Kribbella*, *Micrococcus*, *Micromonospora* та *Streptomyces*). Однак, як видно, спектр родів, виділених цим методом відрізнявся від I. Найменше родове різноманіття ізолятів спостерігали після застосування

Методу II, за яким ізольовано лише два роди актиноміцетів – *Streptomyces* та *Micromonospora*.

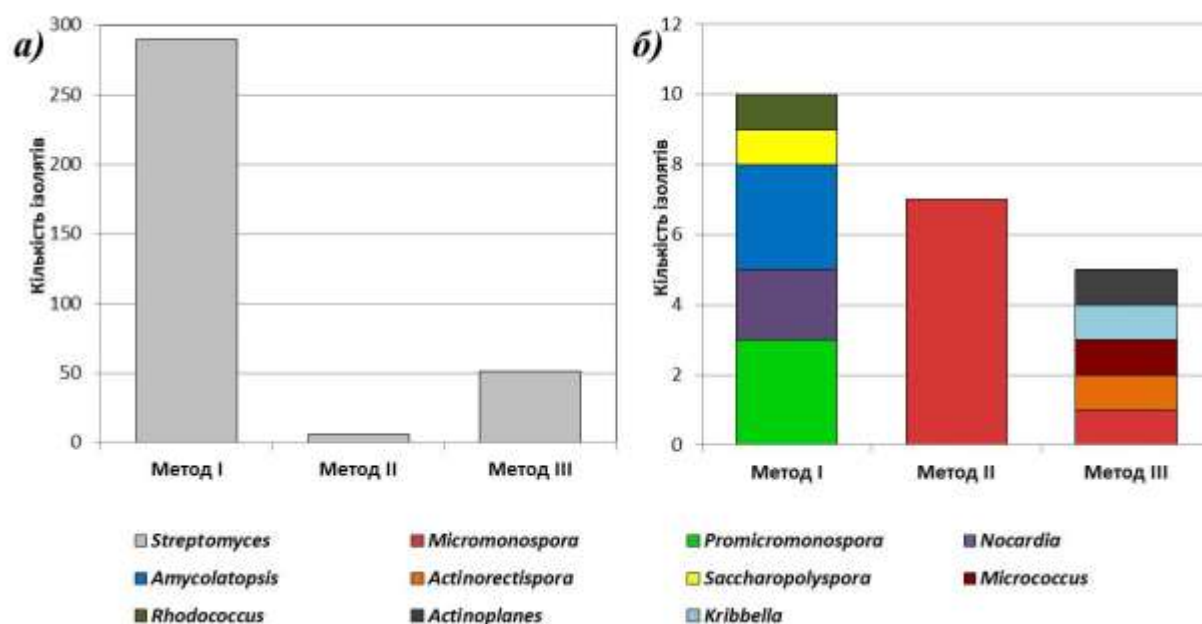


Рис. 3.4. Кількість ізолятів актиноміцетів, виділених різними методами обробки зразків ризосферного ґрунту *J. excelsa*: а) кількість виділених стрептоміцетів; б) кількість виділених не стрептоміцетів.

На таксономічне різноманіття природних ізолятів також впливає склад поживного середовища, на якому їх виділяють. Стрептоміцети, як панівний рід актиноміцетів, виявляли на усіх використаних середовищах й кількісно вони переважали інші роди. Зокрема, всі ізоляти, виявлені на ISP3 були представниками цього роду. На середовищі ISP4 – другому за кількістю виділених актиноміцетів, було виділено чотири не стрептоміцетних роди (*Amicolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus*, та *Micromonospora*). Таку ж кількість не стрептоміцетів виявили на Хітиновому середовищі. Проте, на відміну від ISP4, на цьому середовищі ми виділили представників родів *Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Nocardia* та *Saccharopolyspora*. Серед ізолятів, виділених на середовищі HVA, крім стрептоміцетів ми ідентифікували представників родів *Promicromonospora* та *Micromonospora*. Використання інших середовищ для виділення, таких як

ATCC172, Гаузе 2 та з пропіонатом натрію привело до виділення родів *Rhodococcus*, *Amycolatopsis* та *Promicromonospora*, відповідно.

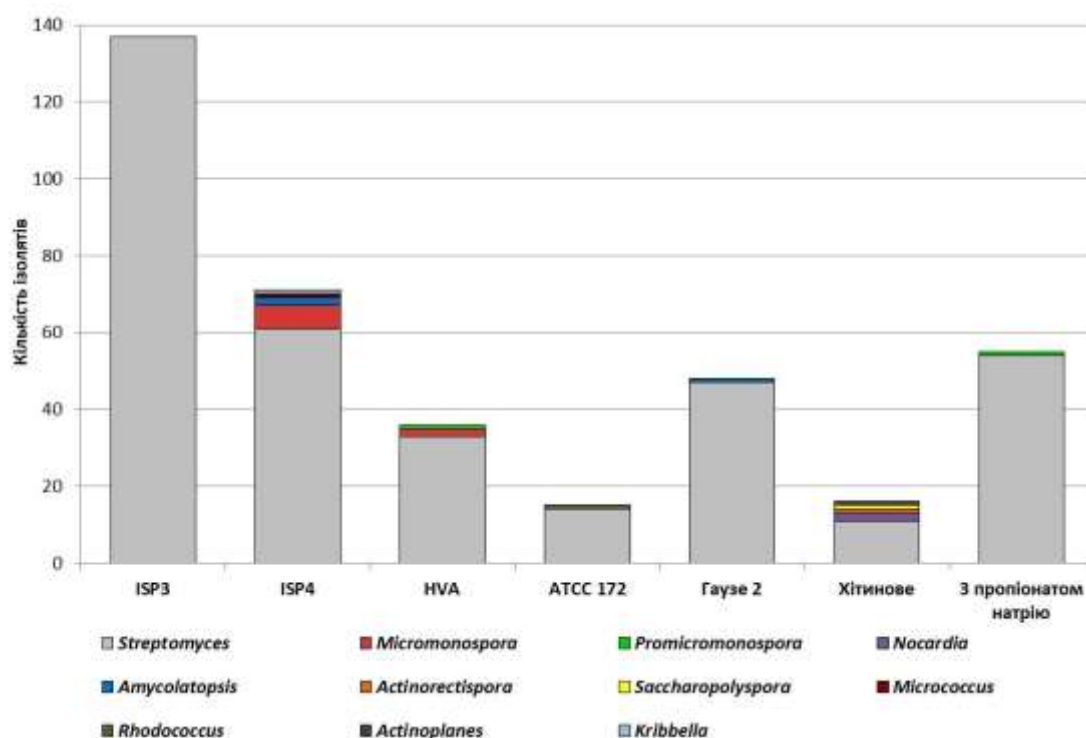


Рис. 3.5. Розподіл родів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* залежно від використаного для виділення середовища.

Філогенію ізолятів актиноміцетів вивчали, використовуючи вирівняні нуклеотидні послідовності генів 16S рРНК. Еволюційна історія була створена методом приєднання сусідів (англ. Neighbor joining (NJ)), де відстані обчислювали з допомогою 2-параметрового методу Кімури [104]. Всі неоднозначні позиції видаляли для кожної пари послідовностей та не брали до уваги під час встановлення філогенетичних зв'язків.

Топологія філогенетичного дерева, створеного за алгоритмом NJ, демонструє, що ізоляти утворювали спільні клади з типовими штамми, які представляли той чи інший рід актиноміцетів. Наприклад, 68 стрептоміцетних ізолятів мають тісні еволюційні зв'язки зі штамом *S. griseus* ATCC10137. Таким способом ми сформували таксономічну групу *Streptomyces griseus*. За цим принципом сформовано ще шість таксономічних груп, названих за типовими штамми стрептоміцетів: *Streptomyces chryseus*, *Streptomyces cyaneogriseus*,

Streptomyces kanamyceticus, *Streptomyces pseudovenezuelae*, *Streptomyces coelicolor* та *Streptomyces platensis*. Серед них група *Streptomyces kanamyceticus* була найбільшою та включала 103 ізоляти. Крім того, поміж виділених стрептоміцетів були такі, які не входили в жодну зі створених груп. Очевидно, що ці ізоляти філогенетично віддалені від типових штамів стрептоміцетів, які обрали для утворення груп (рис. 3.6.).

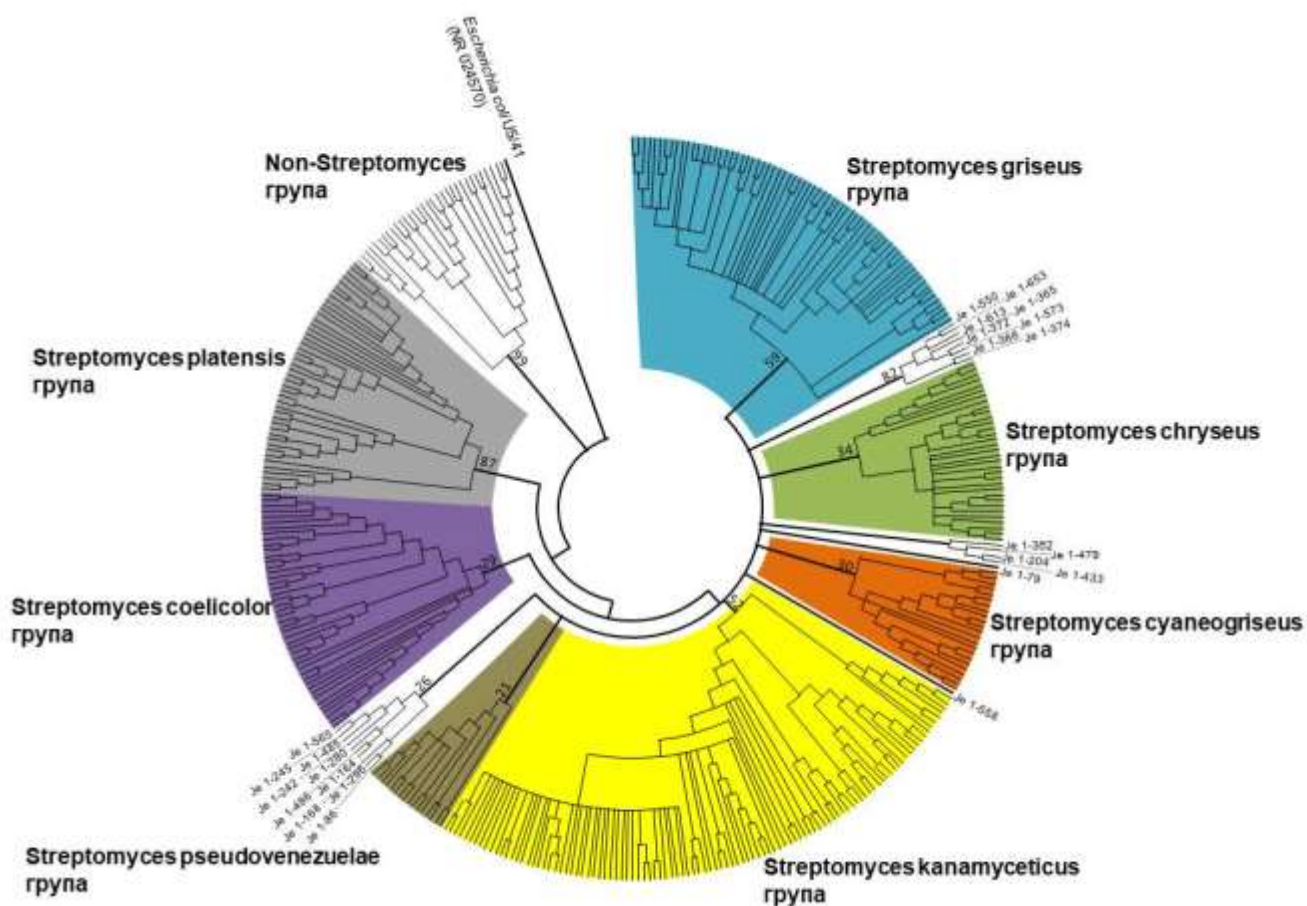


Рис. 3.6. Схема філогенетичних зв'язків ізолятів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* на основі послідовностей генів 16S рРНК. Філогенетичне дерево побудоване з допомогою MEGA 11 методом приєднання сусідів з 1000 початковими повторами. Кольорами показано групи ізолятів, які утворили загальні клади з типовими представниками роду *Streptomyces*. Послідовність 16S рРНК штаму *E. coli* U5/41 (NR_024570.1) використовували для укорінення дерева.

Не стрептоміцетні ізоляти об'єднали окремо в групу Non-Streptomyces, яка включала ізолятів інших родів, ідентифікованих у колекції актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* (рис. 3.7.). Зокрема, ізоляти родів *Actinoplanes* та *Micromonospora* з родини *Micromonosporaceae*. Для представників цієї родини характерні різноманітні середовища існування, наприклад ґрунт, морська та прісна вода, ризосфера, тканини рослин та інші. Крім того, деякі представники цієї родини є промисловими продуцентами таких антибіотиків, як гентаміцин, який продукується *M. purpurea* [235], мегаломіцини, продукується *M. megalomicea* [236], тейкопланін продукується *A. teichomyceticus* [155] та інші.

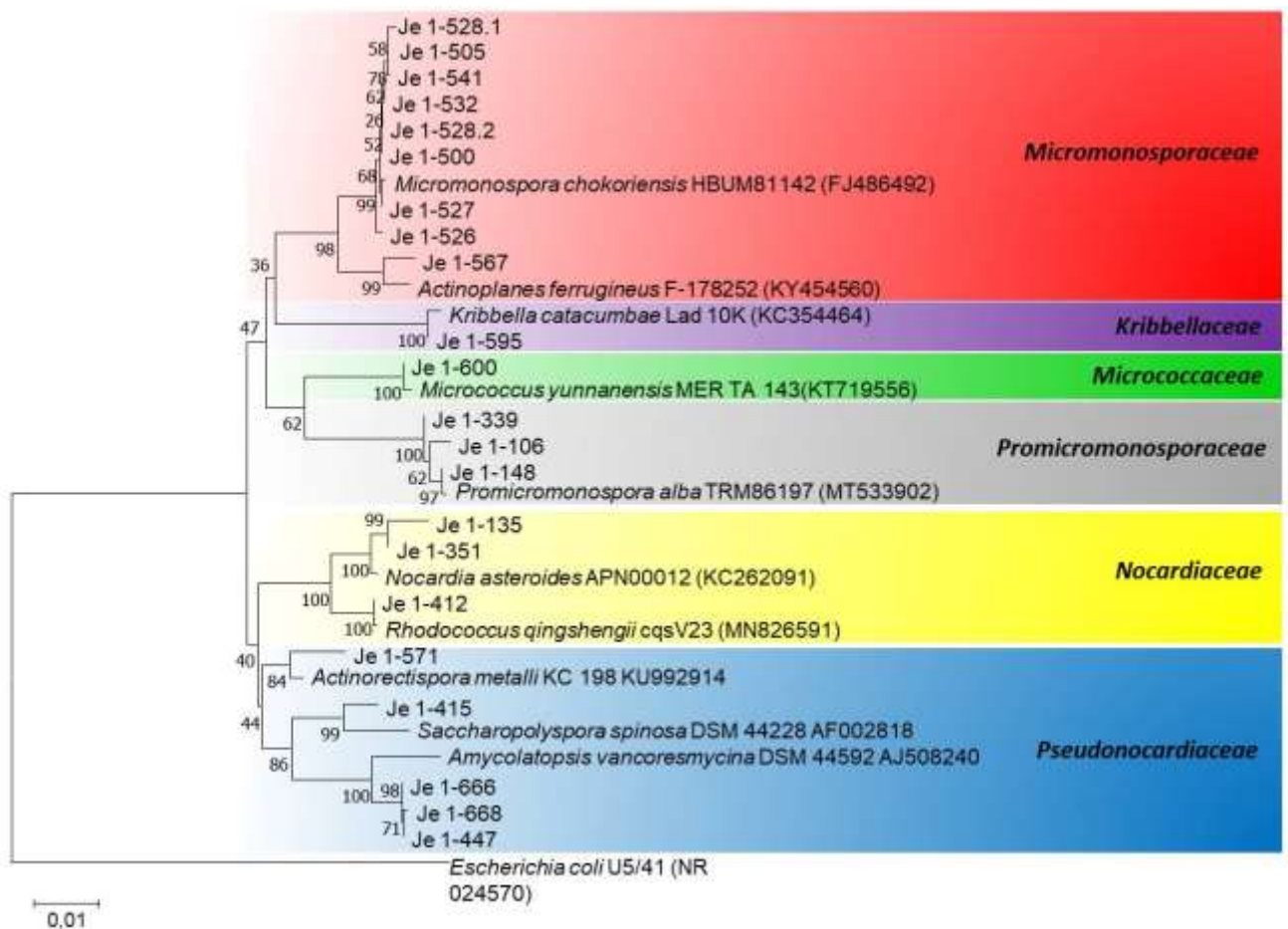


Рис. 3.7. Філогенетичне дерево ізолятів ризосфери *J. excelsa* групи Non-Streptomyces на основі послідовностей гену 16S рРНК. Філогенетичне дерево побудовано з допомогою MEGA 11 з використанням методу приєднання сусідів з 1000 початковими повторами. Послідовність 16S рРНК штаму *E. coli* U5/41 (NR_024570.1) використовували для укорінення дерева.

Варто відмітити представників родини *Pseudonocardiaceae*, яка була другою за кількістю ізолятів серед не стрептоміцетів та включала такі роди, як *Actinorectispora*, *Amycolatopsis* та *Saccharopolyspora*. Як відомо, представники цієї родини актиноміцетів характеризуються великою різноманітністю кластерів біосинтетичних генів, їх вважають перспективним джерелом нових природних сполук [67; 182].

Результати філогенетичної характеристики колекції природних ізолятів актиноміцетів, виділених з ризосфери *J. excelsa* на території Кримського півострова, вказують на їхнє значне біорізноманіття. Найбільш поширені методи виділення дозволили ізолювати 11 родів актиноміцетів, 7 з яких (*Actinorectispora*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Nocardia*, *Rhodococcus* та *Saccharopolyspora*) вважають рідкісними. Таке різноманіття актиноміцетів може обумовлювати значний потенціал до синтезу широкого спектру природних біологічно активних речовин.

3.1.2. Властивості актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* як продуцентів біологічно активних сполук

3.1.2.1. Антимікробна активність

Філогенетичне різноманіття ізолятів актиноміцетів, виділених із ризосфери *J. excelsa*, може передбачати багатий склад біологічно активних сполук, в т.ч. нових. Попередні дослідження окремих ізолятів цього біотопу продемонстрували їхній потенціал продукувати нові біологічно активні сполуки [169; 171; 220].

Ми дослідили антагоністичні властивості ізолятів щодо умовно-патогенних мікроорганізмів. Для цього використали грампозитивні (*B. subtilis* та *S. aureus*), грамнегативні (*E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumonia* та *P. aeruginosa*) бактерії та дріжджі *C. albicans*.

Серед 372 ізолятів актиноміцетів майже половина пригнічували ріст принаймні одного з використаних умовно-патогенних мікроорганізмів. Більшість із них були антагоністами грампозитивних бактерій *B. subtilis* (35,5% ізолятів) та *S. aureus* (19,6% ізолятів). Поміж антагоністів грампозитивних бактерій низький

ІАА проти *B. subtilis* та *S. aureus* мали 23,9% та 16,4% ізолятів, відповідно. Середнє значення ІАА виявляли у 10,8% та 3,0% ізолятів проти *B. subtilis* та *S. aureus*, відповідно. Високий ІАА був виявлений у менш, ніж 1,0% ізолятів проти обидвох тест-культур грампозитивних бактерій.

Близько 5,0% ізолятів продукували антибіотичні сполуки проти грамнегативних бактерій *E. coli* і *P. vulgaris*, тоді як ріст *K. pneumonia* затримувало 3,8%. Найменше досліджуваних ізолятів (1,9%) виявляли антагоністичні властивості проти *P. aeruginosa*. Низький ІАА проти цих тест-культур, виявлений в межах від 1,1% (проти *K. pneumonia*) до 3,8% (проти *E. coli*) ізолятів. ІАА 3-6 проти цих бактерій був в межах від 0,5% до 2,2% проти *P. aeruginosa* та *K. pneumonia*, відповідно. Високий ІАА проти *K. pneumonia* та *P. vulgaris* виявлено лише у двох актиноміцетних ізолятів. У свою чергу, антагоністів з ІАА більше 6 проти *E. coli* та *P. aeruginosa* не виявлено.

В колекції досліджуваних ізолятів ми виявили майже 10% потенційних продуцентів протигрибкових сполук, які пригнічували ріст *C. albicans*. Більшість з яких (8,6%) мали низький ІАА і лише 1,1% були активними на рівні ІАА 3-6 (рис. 3.8.).

Крім антибіотичної активності проти умовно-патогенних мікроорганізмів, ми дослідили активність актиноміцетних ізолятів проти фітопатогенних мікроорганізмів. Понад 60% досліджуваних ізолятів затримували ріст хоча б однієї з використаних тест-культур фітопатогенних бактерій. Найбільше антагоністів (146 або 39,2%) виявили проти *X. campestris* pv. *campestris*, збудника судинного бактеріозу широкого кола сільськогосподарських культур. Більшість з них мали ІАА не більше 3, середній і високий рівень ІАА був властивий 8,3% і 1,6% ізолятів, відповідно. Приблизно однакова кількість ізолятів пригнічувала ріст *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, збудника кутастої плямистості квасолі (115 або 30,9%), та *E. amylovora*, збудника бактеріального опіку плодових культур (110 або 29,6 %). Проте, розподіл ІАА ізолятів проти цих тест-культур відрізнявся. Наприклад, ІАА менше 3 мали понад 22% антагоністів *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* і 16,4% антагоністів *E. amylovora*. Натомість середній і високий ІАА

був властивий більшій кількості ізолятів *E. amylovora* – 11,8% і 1,4%, відповідно, проти 8,1% і 1,4% антагоністів *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, відповідно.

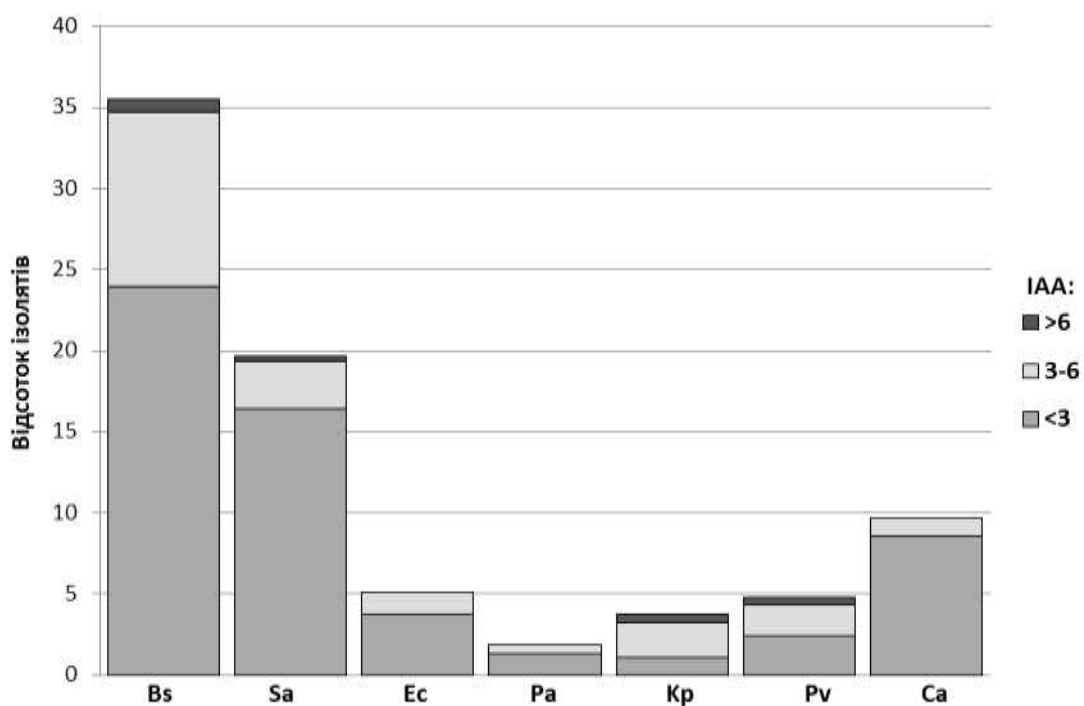


Рис. 3.8. Антимікробна активність ізолятів актиноміцетів проти умовно-патогенних мікроорганізмів. IAA – індекс антимікробної активності; Bs – *B. subtilis*; Sa – *S. aureus*; Ec – *E. coli*; Pa – *P. aeruginosa*; Kp – *K. pneumoniae*; Pv – *P. vulgaris*; Ca – *C. albicans*.

По 7,8% ізолятів пригнічували ріст *P. carotovorum*, збудника м'якої гнилі та чорної ніжки картоплі та *A. tumifaciens*, що спричиняє утворення корончастих галів. Низький IAA ізолятів актиноміцетів проти цих бактерій був 4,6% для антагоністів *P. carotovorum* та 6,5% - *A. tumifaciens*. У свою чергу середнє значення IAA мали 2,7% та 1,3% ізолятів проти *P. carotovorum* та *A. tumifaciens*, відповідно. 0,5% ізолятів демонстрували високий IAA проти *P. carotovorum*, однак для антагоністів *A. tumifaciens* IAA більше 6 не виявлено. Лише 12 ізолятів (3,2%) були антагоністами *P. syringae*, що спричиняє обмороження та плямистість рослин. IAA більшості з них не перевищував 3, за винятком 0,5% ізолятів з середнім рівнем активності. Трохи більше 1% антагоністів пригнічували ріст *P.*

fluorescens, що спричиняє м'яку гниль у рослин, а їхній ІАА не перевищував 3 (рис. 3.9.а).

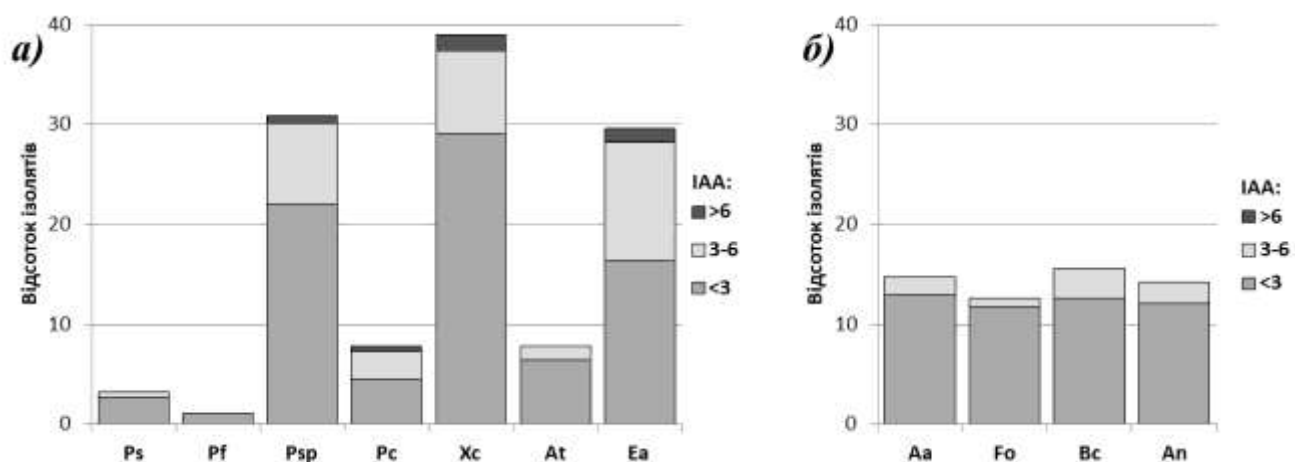


Рис. 3.9. Антагоністичні властивості актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* щодо фітопатогенних бактерій (а) і грибів (б). ІАА: індекс антимікробної активності; Ps: *P. syringae*; Pf: *P. fluorescens*; Psp: *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*; Xc: *X. campestris* pv. *campestris*; At: *A. tumifaciens*; Ea: *E. amylovora*; Aa: *A. alternata*; Fo: *F. oxysporum*; An: *A. niger*, Bc: *B. cinerea*.

Антифунгальну активність проти хоча б однієї тест-культури фітопатогенних грибів виявляли у 96 ізолятів, що становило 25,8%. Понад 15% пригнічували ріст *B. cinerea*, збудника сірої гнилі рослин. Дещо менше ізолятів (близько 14%) були антагоністами *A. alternata*, що спричиняє гниль томатів та *A. niger*, який є збудником аспергильозу. Найменша кількість антагоністів (12,6%) виявлена проти *F. oxysporum*, що спричиняє судинне (трахеомікозне) в'янення рослин. Рівень антифунгальної активності більшості досліджених ізолятів не перевищував значення ІАА 3. Незначна кількість ізолятів виявляли вищий ІАА 3-6, найбільше їх було серед антагоністів *B. cinerea* (2,9%), найменше – серед антагоністів *F. oxysporum* (0,8%) (рис. 3.9.б).

Більшість ізолятів, які виявляли антибіотичну активність, були представниками роду *Streptomyces*. У той же час, значна частина представників інших родів не виявляли інгібувальної активності. Лише ізоляти роду

Amycolatopsis (Je 1-447 і Je 1-666) були антагоністами *B. subtilis*, деяких фітопатогенних грамнегативних паличок і фітопатогенних грибів. Також ізолят *Actinorectispora* sp. Je 1-571 пригнічував ріст *B. subtilis* і *S. aureus*. Відомо, що склад поживних середовищ має значний вплив на продукцію вторинних метаболітів актиноміцетами. Оскільки більшість досліджуваних ізолятів були представниками роду *Streptomyces*, ми застосували середовище ISP3, яке є досить сприятливим для продукції вторинних метаболітів представниками цього роду. Ізоляти інших, здебільшого рідкісних, родів потребують очевидно підбирання спеціальних умов ферментації [8]. Широкий спектр антимікробної активності досліджуваних актиноміцетів є передумовою для глибшого дослідження окремих ізолятів з метою вивчення спектру і природи біологічно активних сполук, які вони продукують.

3.1.2.2. Потенційні фітостимулювальні властивості

Актиноміцети відіграють важливу роль у процесах ґрунтоутворення. Здатність розкласти складні компоненти у верхніх шарах ґрунтового покриву, зокрема складні полісахариди, такі як крохмаль, хітин, пектин, целюлоза, геміцелюлози та лігноцелюлози тощо, робить їх однією з основних груп мікроорганізмів, які сприяють збереженню та поліпшенню родючості ґрунту [21]. Окрім того, ці бактерії беруть участь у кругообігах Карбону, Нітрогену, Фосфору, Калію та інших елементів у ґрунті перетворюючи їх у більш доступні форми для засвоєння рослинами [132]. Деякі роди актиноміцетів також продукують фітогормони (наприклад, ауксини та цитокініни), які стимулюють ріст та розвиток рослин [36]. Це може сприяти покращенню мінерального живлення, зокрема через збільшення кореневої системи.

Для дослідження потенційних фітостимулювальних властивостей ізолятів актиноміцетів, визначали їхню здатність синтезувати ІОК, солюбілізувати нерозчинні форми Фосфору, продукувати сидерофори, асимілювати атмосферний азот (рис. 3.10.a). Близько 12% досліджуваних актиноміцетів (44 ізоляти)

продукували сидерофори, які здатні хелатувати іони металів, зокрема Fe^{3+} (рис. 3.10.а і б). Це сприяє збільшенню концентрації біодоступного Феруму в ґрунті.

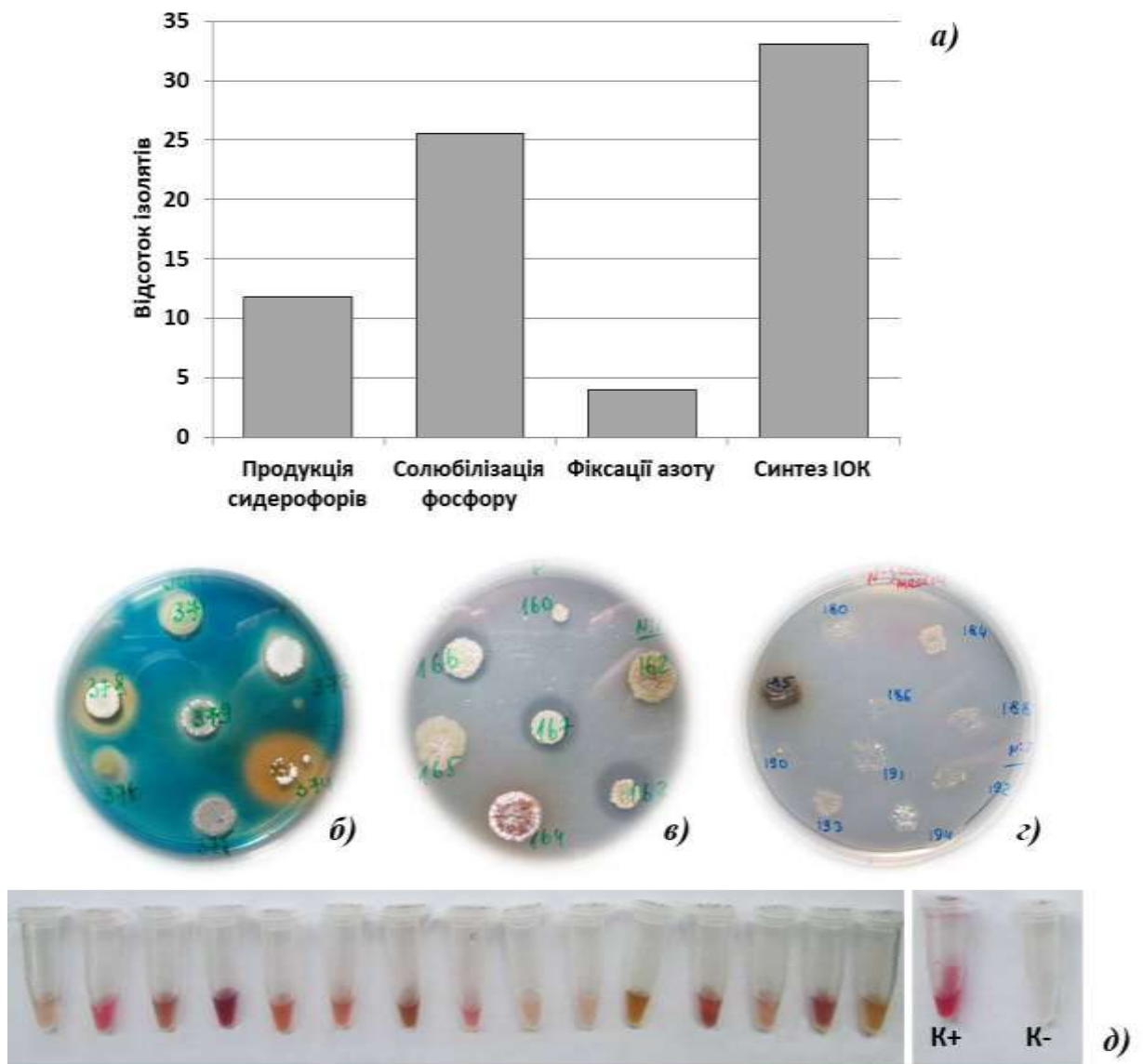


Рис. 3.10. Фітостимулювальні властивості актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*: а) загальна кількість ізолятів актиноміцетів із фітостимулювальними властивостями; б) синтез сидерофорів; в) солюбілізація нерозчинних форм Фосфору; г) фіксування атмосферного азоту; та д) синтез ІОК.

Чверть досліджених ізолятів здатні солюбілізувати нерозчинні форми Фосфору (рис. 3.10.а і в). Цей елемент мінерального живлення є надзвичайно

важливим для продуктивності рослин, беручи участь у різноманітних функціях від клітинного енергетичного метаболізму до передачі генетичних характеристик через покоління. Однак, Фосфор в ґрунті часто перебуває у зв'язаному стані у вигляді фосфату кальцію, фосфату алюмінію чи фосфату феруму, недоступними для засвоєння рослинами [122]. Виявлені природні ізоляти актиноміцетів, які солюбілізують сполуки Фосфору, можуть сприяти мінеральному живленню рослин.

Нітроген, що міститься в атмосфері у вигляді газу (N_2) є не доступним для рослин. Однак, значна кількість бактерій, що сприяють росту рослин здатні до біологічної фіксації азоту, перетворюючи його на NH^{4+} , який є доступний для рослин [18]. Використовуючи середовище, яке не містило джерел Нітрогену, ми протестували здатність ізолятів актиноміцетів до азотфіксації. Виявили 15 ізолятів, які були здатні рости за таких умов (рис. 3.1.a і з). Усі вони представляють роди *Nocardia* та *Streptomyces*. Цікаво, що, жодний ізолят роду *Micromonospora* в наших експериментах не виявляв потенційної здатності фіксувати атмосферний азот. Хоча для представників цього роду, як і для актиноміцетів роду *Frankia*, така властивість описана [108].

Крім того, ми виявили 123 (33,1%) ізоляти актиноміцетів, які в середовищі SG з триптофаном здатні продукувати ауксин-подібні сполуки (рис. 3.10.a і д). Ці фітогормони регулюють різні процеси росту та розвитку рослин, таких як поділ, розширення, диференціювання клітин і розвиток плодів. Гомеостаз яких важливий для підтримки гормонального балансу на оптимальному рівні, придатному для нормального росту та розвитку рослин [30].

Деякі ізоляти поєднували кілька з досліджених властивостей. Зокрема, *Streptomyces* spp. Je 1-149, Je 1-221, Je 1-246, Je 1-332, Je 1-489, Je 1-493, Je 1-494 та Je 1-548 продукували сидерофори, солюбілізували нерозчинні форми Фосфору та синтезували ІОК. У свою чергу ізоляти Je 1-57 та Je 1-213 солюбілізували нерозчинні форми Фосфору, синтезували ІОК та фіксували атмосферний азот. Також, ізоляти із ріст-стимулювальними властивостями виявляли антимікробну активність проти фітопатогенних мікроорганізмів. Зокрема, стрептоміцети Je 1-

221 і Je 1-246 були антагоністами *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, а *Streptomyces* sp. Je 1-213 був активний проти *A. niger*. Поєднання фітостимулювальних та антагоністичних властивостей може бути перспективним у використанні окремих ізолятів у розробленні нових біопрепаратів для рослинництва.

Таким чином, виділені з ризосфери *J. excelsa* на території Кримського півострова ізоляти актиноміцетів мають значний потенціал до продукування широкого спектру біологічно активних сполук. Велика частка ізолятів, очевидно, є джерелом антибіотиків як з антибактерійною, так і антифунгальною дією. Серед них з високою імовірністю можуть бути нові сполуки. Також досліджені ізоляти різних родів можуть бути продуцентами фітостимулювальних сполук, таких як ауксини, сидерофори тощо. Здатність однієї культури поєднувати широкий діапазон властивостей від синтезу антимікробних сполук до продукування фітогормонів робить її перспективною платформою для розробки біопрепаратів для сільського господарства.

3.1.2.3. Метаболічне профілювання окремих ізолятів актиноміцетів

Аналізуючи одержані результати антибіотичної активності ми виявили, що ізоляти значно відрізнялися за спектром та рівнем антимікробної активності. Серед них були як ізоляти, здатні специфічно пригнічувати тільки одну тест-культуру, так й антагоністи широкого кола мікроорганізмів (див. Додаток Б, табл. Б1.).

Серед досліджуваних ізолятів, ми відібрали три, які мали різний спектр антимікробної дії. Ізолят *Streptomyces* sp. Je 1-42 продемонстрував високий рівень антибіотичної активності проти грампозитивних бактерій (*B. subtilis*, *S. aureus*), цвілевих грибів (*A. alternata*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *A. niger*) та дріжджів *C. albicans*. *Streptomyces* sp. Je 1-93 інгібував ріст лише *C. albicans*, а рівень його антибіотичної активності був помітно високий. *Streptomyces* sp. Je 1-651 виявляв потужну антагоністичну активність проти більшості з використаних мікробних тест-культур, за винятком *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* та *F. oxysporum*.

Для розуміння природи сполук, які ймовірно відповідають за спостережувану активність цих ізолятів, ми проаналізували їхні вторинні метаболіти. Для цього культури актиноміцетів культивували в ферментативних середовищах SG чи DNPM. Для екстракції використовували етилацетат при екстрагуванні з культуральної рідини та суміш ацетон:метанол (1:1) при екстрагуванні з біомаси. Отримані екстракти ізолятів аналізували з допомогою ВЕРХ-МС та виконували дереплікативний аналіз вторинних метаболітів.

За результатами ВЕРХ-МС в екстрактах ізоляту Je 1-42 ідентифіковано 4 основних піки сполук (рис. 3.11.). Пік 1 утворювала сполука з масою m/z 1197,7547 Да $[M+H]^+$, яка за ануванням в базі даних DNP відповідала десертومیцину А. Сполука з масою m/z 1055,6248 Да $[M+H]^+$ утворювала пік 2 та анована, як канханаміцин А. Піки 3 і 4 утворювали сполуки з масами m/z 392,2699 Да $[M+H]^+$ та m/z 478,2223 Да $[M+H]^+$ та ановані як стрепторубін В (бутилциклогептилпродигіозин) та спектинабілін, відповідно. Вказані піки виявляли в екстрактах як з біомаси, так і культуральної рідини.

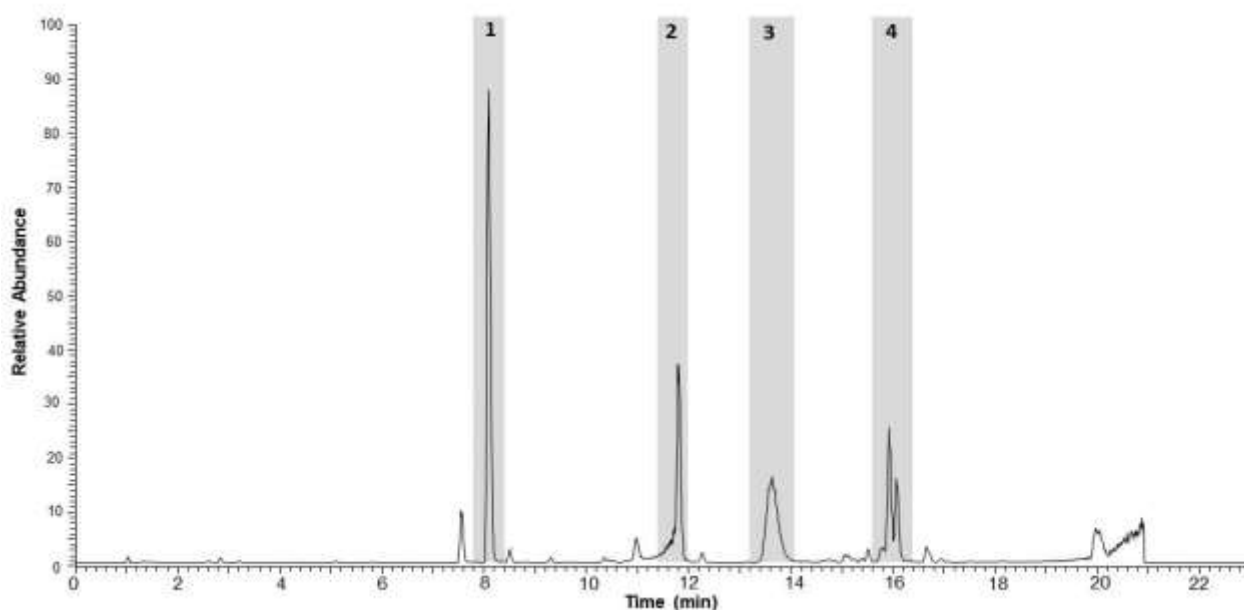


Рис. 3.11. Результати ВЕРХ-МС аналізу екстракту з культуральної рідини *Streptomyces* sp. Je 1-42. Ідентифіковані піки: 1 – десертومیцин А; 2 – канханаміцин А; 3 – стрепторубін В; 4 – спектинабілін.

Антибіотики десертomicин А та канханаміцин А були раніше виділені з штамів стрептоміцетів та активні проти грампозитивних, грамнегативних бактерій, дріжджів та грибів [204; 227]. Стрепторубін В належить до групи продигіозинів із широким спектром біологічних активностей, у тому числі антибактерійну, анатифунгальну та протималарійну [19]. В екстракті Je 1-42 також виявили нітрофеніл-вмісний полікетидний антибіотик спектинабілін, якому властиві противірусна та протималарійна активності [95]. Продукція цих сполук досліджуваним ізолятом актиноміцетів, очевидно, зумовлює його здатність пригнічувати ріст широкого кола бактерій та грибів.

За такою ж схемою визначали метаболіти ізоляту *Streptomyces* sp. Je 1-93. Однак, для покращення дереплікації, екстракт розділяли, використовуючи ексклюзивну хроматографію. Розділення фракцій метаболітів проводили в скляній колонці, наповненій сефадексом LH-20. Метанол використовували як рухому фазу. В результаті отримали 60 фракцій екстракту. Отримані фракції відбирали та аналізували їхню здатність пригнічувати ріст *C. albicans*, в результаті чого відібрали 12 активних фракцій (від 34 до 45) (рис. 3.12.a).

Визначені активні фракції змішували та аналізували за допомогою ВЕРХ-МС. На хроматограмі активної фракції, отриманої після розділення, ідентифікували два основні масові піки. За допомогою високоточної мас-спектрометрії визначили маси сполук, що утворюють ці піки. Піку 1 відповідала сполука з часом виходу (Чв) 14,98 хв та масою m/z 549,28 Да $[M+H]^+$, піку 2 – сполука з Чв 15,55 хв та масою m/z 563,29 Да $[M+H]^+$ (рис. 3.12.б).

Використовуючи дереплікативний аналіз моноізотопних мас ідентифікованих сполук в базі даних DNP, ми визначили їх як антиміцин А1 та А10. Крім того, на отриманій хроматограмі виявили й інші сполуки з групи антиміцинів, зокрема антиміцини А3, А12, А14, А15 та А16 (рис. 3.12.в). Для цієї групи природних антибіотиків стрептоміцетного походження, яких на сьогодні відомо більше 40, притаманна сильна антитифунгальна активність [189].

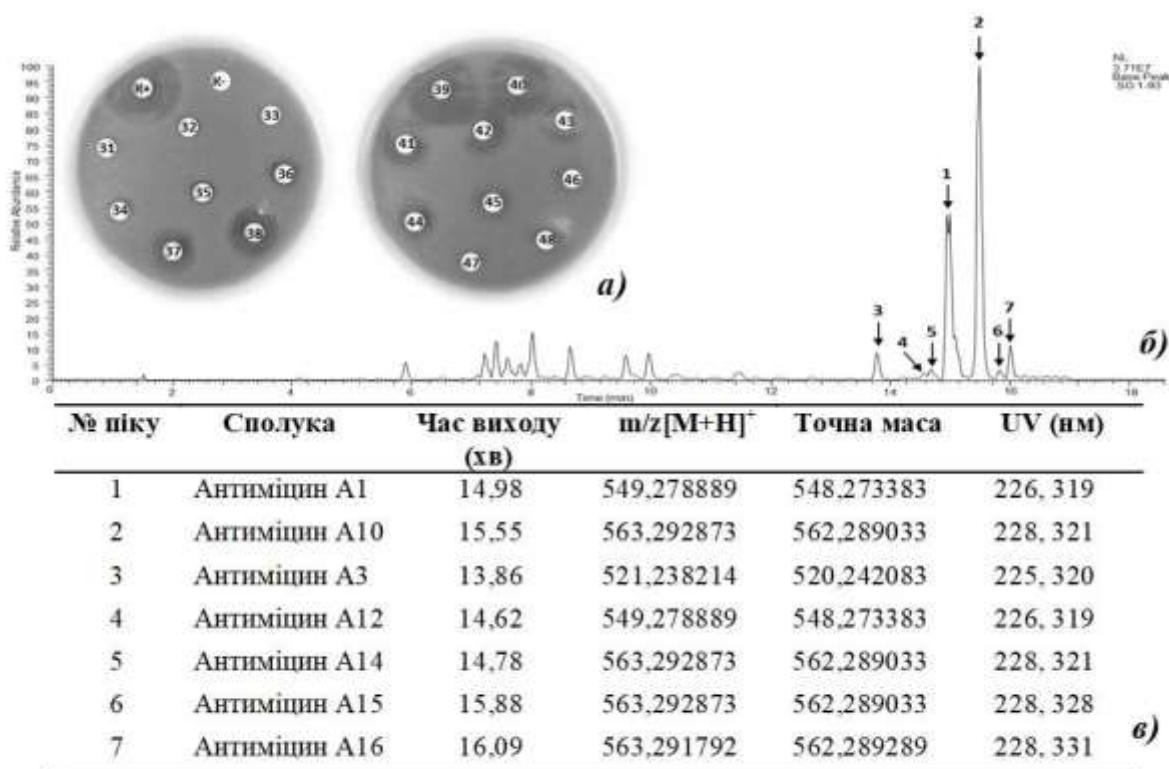


Рис. 3.12. Результати хімічного аналізу активних фракцій екстракту *Streptomyces* sp. Je 1-93 після розділення на колонці з сефадексом: а) антифунгальна активність проти *C. albicans*: К+ - не розділений екстракт, К- – метанол, 31-48 – фракції розділеного екстракту; б) ВЕРХ-МС хроматограма суміші активних фракцій екстракту, стрілками вказано ідентифіковані антиміцини; в) характеристика ідентифікованих антиміцинів.

Таким чином, потужний антифунгальний ефект штаму *Streptomyces* sp. Je 1-93 може бути зумовлений продукуванням комплексу антиміцинів, мажорні фракції яких ми виявили в його екстракті.

Природний ізолят *Streptomyces* sp. Je 1-651 вирізнявся широким спектром антибіотичної дії, пригнічуючи більшість тест-культур бактерій і грибів, які ми застосовували під час вивчення антагоністичних властивостей. До того ж, рівень його ІАА був в межах 3-6 або вище. Вторинні метаболіти цього штаму досліджували подібно до попередніх ізолятів.

В результаті аналізу отриманих ВЕРХ-МС хроматограм екстрактів цього ізоляту ми ідентифікували 18 піків вторинних метаболітів після культивування в

SG і DNPM середовищах (рис. 3.13.). З допомогою бази даних DNP, сім з них були анотовані, як антибіотики спіраміцини. Піки, які утворювали спіраміцини були присутні на всіх досліджуваних хроматограмах, отриманих після вирощування в обох середовищах та при різних методах екстракції, хоча їхня кількість і величина були різними. Крім спіраміцинів, в неочищеному екстракті з біомаси ізоляту Je 1-651, який вирощували в середовищі SG, ми ідентифікували три великі піки, які були анотовані, як стамбоміцин A/B (Чв 9,08; m/z 1376,9378 Да $[M+H]^+$), стабоміцин C/D (Чв 8,7; m/z 1362,9238 Да $[M+H]^+$), стамбоміцин E (Чв 8,39; m/z 1348,9108 Да $[M+H]^+$) і стамбоміцин F (Чв 9,66; m/z 1390,9558 Да $[M+H]^+$) (рис. 3.13.б).

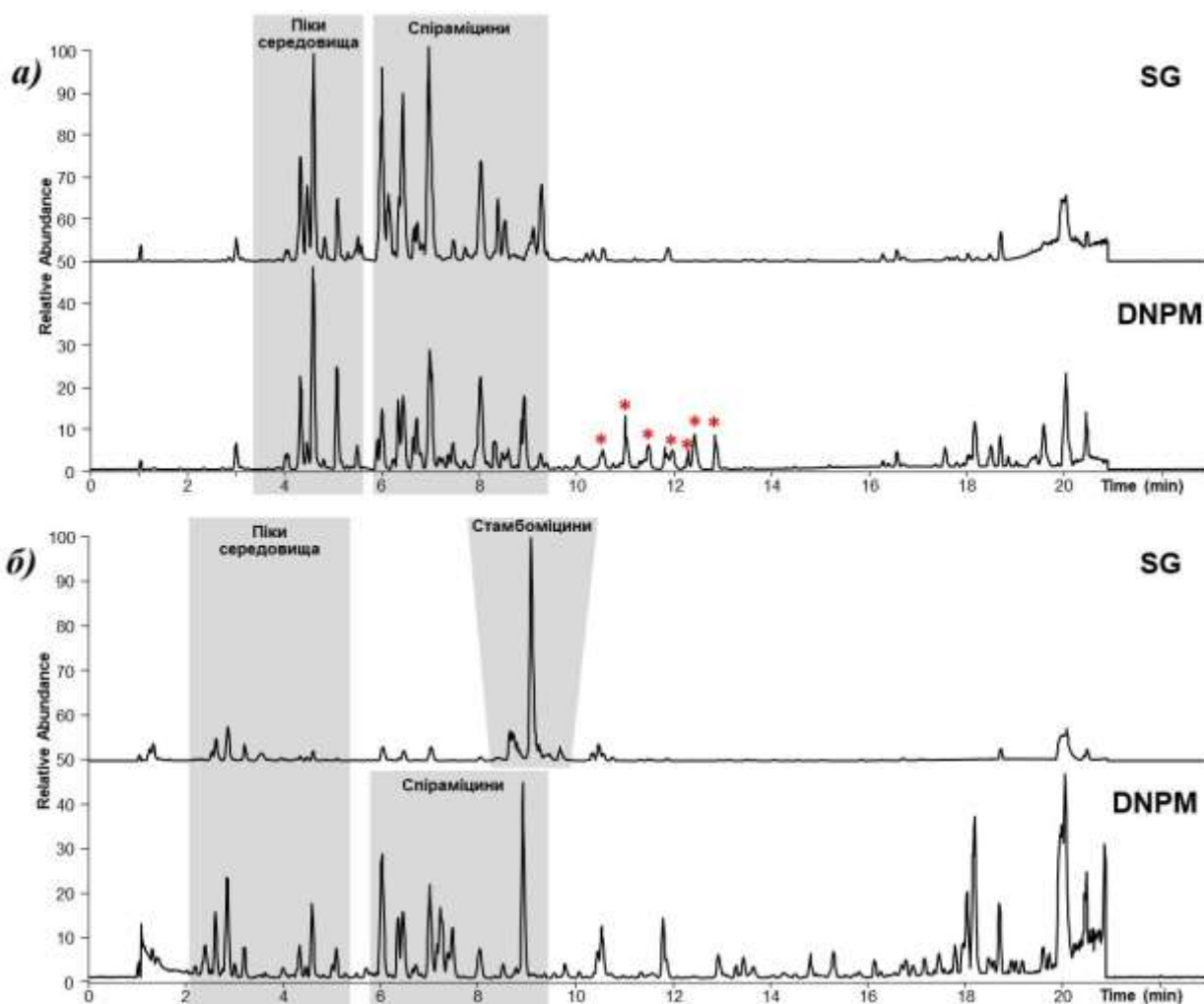


Рис. 3.13. Результати ВЕРХ-МС аналізу хімічного аналізу вторинних метаболітів *Streptomyces* sp. Je 1-651: а) етилацетатні екстракти; б) ацетон:метанольні

екстракти. Червоними зірочками вказано сполуки, які не були ідентифіковані в базі даних DNP.

У етилацетатних екстрактах вторинних метаболітів, отриманих після вирощування Je 1-651 в середовищі DNPM, ідентифікували сім піків, для яких не виявили позитивних збігів у базі даних DNP. Це не дало змоги анотувати їх на основі доступних даних мас-спектрометрії і може вказувати про новизну цих сполук. Характеристики ідентифікованих піків, які утворюють невідомі сполуки, наведені в Таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Результати дереплікативного аналізу вторинних метаболітів ізоляту *Streptomyces* sp. Je 1-651, отриманих в результаті культивування в середовищі DNPM та екстракції етилацетатом з культуральної рідини

№ п/п	Чв (хв)	Маса, m/z (M+H ⁺)	Точна маса, m/z (M-H ⁺)	Адукти	Дереплікація в базі даних DNP		
					Назва	Точна маса	Продуцент
1	6,33	843,52118	842,513904	M+Na 2M+H	Спіраміцин А	842,514	<i>S. ambofaciens</i>
2	6,43	885,53174	884,524464	M+Na	Спіраміцин В	884,5145	<i>S. ambofaciens</i>
3	6,67	885,53125	884,52457	M+Na	Спіраміцин В	884,5145	<i>S. ambofaciens</i>
4	6,98	899,54681	898,539534	M+Na 2M+H	Спіраміцин С	898,540	<i>S. ambofaciens</i>
5	7,67	848,49945	847,49217	M+Na	Спіраміцин S	847,492	<i>S. ambofaciens</i>
6	8,01	846,48615	845,47887	M+Na	Спіраміцин U	845,477	<i>S. ambofaciens</i>
7	9,25	902,51062	901,50334	M+Na	3- Пропаноїлспіраміцин U	901,5035	<i>Streptomyces</i> sp. SF2757
8	10,4	1175,6842	1174,6769	M+2H M+Na	-	-	-
9	10,53	1189,7003	1188,693	M+2H M+Na	-	-	-
10	11,0	1203,7169	1202,7096	M+2H M+Na	-	-	-
11	11,46	1217,7314	1216,7241	M+2H M+Na	-	-	-
12	11,85	1245,7269	1244,7196	M+2H M+Na	-	-	-
13	12,4	1259,7407	1258,7334	M+2H M+Na	-	-	-
14	12,85	1273,7595	1272,7522	M+2H M+Na	-	-	-

Дерепликативний аналіз дозволив частково пов'язати спостережувану антибіотичну активність ізоляту *Streptomyces* sp. Je 1-651 з конкретними сполуками, для яких описана біологічна дія. Цілком ймовірно, що здатність Je 1-651 пригнічувати ріст грампозитивних, грамнегативних бактерій і дріжджів обумовлена продукуванням спіраміцинів, зважаючи на їхній широкий спектр активності [111]. Варто також зазначити, що спіраміцини та стамбоміцини є продуктами штаму *S. ambofaciens* [4]. Це нашо вхує на думку, що досліджуваний ізолят, можливо, філогенетично пов'язаний зі штамми *S. ambofaciens*. Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК ізоляту Je 1-651 вказав на 100% ідентичність з типовими штамми *S. ambofaciens*. Крім того, на філогенетичному дереві ці штамми утворювали спільну кладу (рис. 3.14), що вказує на їхні тісні філогенетичні зв'язки. З огляду на отримані результати філогенетичного аналізу та дерепликації, ізолят Je 1-651 може бути досить близьким до штамів *S. ambofaciens*.

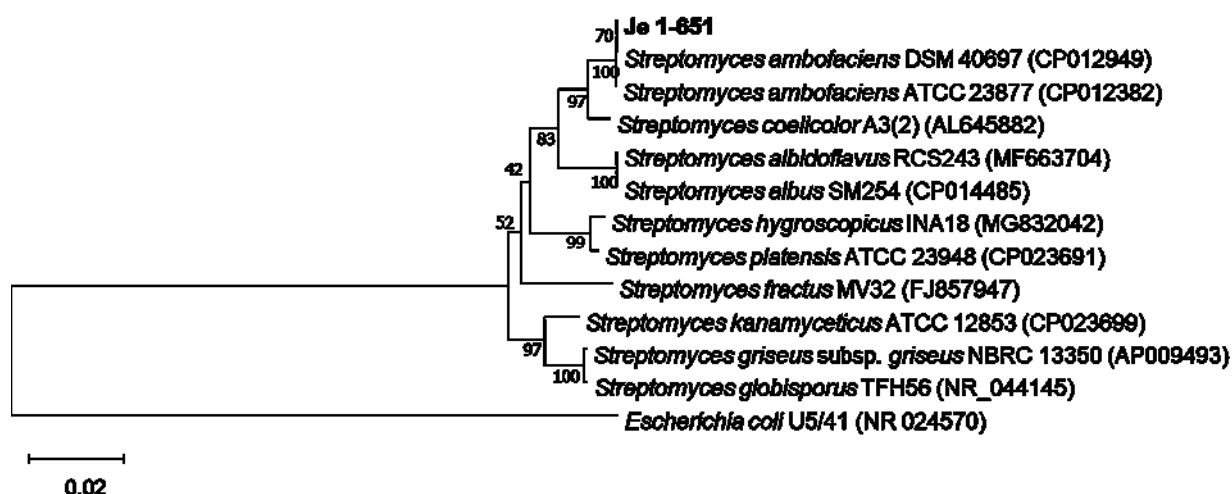


Рис. 3.14. Філогенетичне дерево на основі послідовностей генів 16S рРНК ізоляту Je 1–651 (виділені жирним), його найближчих сусідів і вибраних типових штамів роду *Streptomyces*. *E. coli* U5/41 використовували для укорінення дерева. Смужка вказує на 0,02 заміни на нуклеотидну позицію.

Кластери біосинтетичних генів спіраміцину та стамбоміцину ізоляту Je 1–651 можуть значно відрізнятися від біосинтетичних кластерів у описаних штамів,

як це досліджено на прикладі еволюції кластеру біосинтезу антиміцину [93]. Такі відмінності можуть забезпечити селективні переваги у відповідному середовищі існування. Оскільки антибіотик спіраміцин широко використовується, необхідні подальші дослідження цього ізоляту, особливо щодо рівня продукції спіраміцину. Крім того, ідентифікація нових продуцентів також має практичне значення, через те, що вони можуть виявитися більш зручними (наприклад, швидкий ріст, вища продукція або краще підходять для генно-інженерних маніпуляцій), ніж штами, які зараз використовують. Це перше повідомлення про виділення продуцента антибіотика спіраміцину з українських біотопів.

Підсумки до розділу

Таксономічний аналіз 372 ізолятів на основі нуклеотидних послідовностей генів 16S рРНК дозволив ідентифікувати їх як представників класу *Actinomycetia*. Ізоляти представлені 11 родами актиноміцетів: *Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora* та *Streptomyces*. Встановлено, що близько 43% актиноміцетних ізолятів були антагоністами умовно-патогенних мікроорганізмів. Серед яких найбільше ізолятів були активними проти грампозитивних бактерій *B. subtilis* та *S. aureus*. Понад 60% ізолятів затримували ріст хоча б однієї з використаних тест-культур фітопатогенних мікроорганізмів. Серед антагоністів фітопатогенних мікроорганізмів найбільше ізолятів пригнічували ріст грамгенативних бактерій *X. campestris* pv. *campestris*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* та *E. amylovora*. Для значної частини природних ізолятів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* властиві потенційні фітостимулювальні властивості через здатність продукувати ауксини, сидерофори солюбілізувати нерозчинні форми Фосфору, асимілювати атмосферний азот. Деякі ізоляти здатні поєднувати фітостимулювальні властивості з антимікробними, що робить їх перспективними для розробки нових біопрепаратів для рослинництва.

Використовуючи метаболічне профілювання екстрактів вторинних метаболітів вибраних ізолятів, ми виявили продуцентів десерторміцину А,

канханаміцину А, стрепторубіну В, спектинабіліну (*Streptomyces* sp. Je 1-42); антиміцинів (*Streptomyces* sp. Je 1-93); спіраміцинів та стамбоміцинів (*Streptomyces* sp. Je 1-651).

Представлені вище результати опубліковано у статтях [218; 259 – 261] патентах [256] та матеріалах конференцій [246; 250 – 253; 258].

3.2. Скринінг продуцентів антибіотиків з використанням біосенсорів

Як уже зазначалося, природні сполуки мікробного походження відіграють вагомую роль у медицині, ветеринарії та сільському господарстві, як терапевтичні агенти для лікування різноманітних інфекційних захворювань людини і тварини, засоби біоконтролю тощо. Сьогодні розроблено численні методи скринінгу природних біоактивних сполук [14], одним із яких є використання цілюноклітинних біосенсорів, специфічних для виявлення певних груп (класів) або окремих сполук [156]. Мікробні біосенсори дозволяють зробити процес скринінгу направленим та можуть значно прискорити цей процес, хоча найочевиднішою перевагою їхнього використання є безпосереднє виявлення цільового метаболіту.

3.2.1. Скринінг продуцентів тіопептидних антибіотиків

Тіопептиди (тіазолілові пептиди) – велика група високомодифікованих сульфур-вмісних пептидних антибіотиків [12]. Мікрококцин був першим антибіотиком з цієї групи, який відкрили у середині 20 століття. З того часу було ідентифіковано близько 100 тіопептидів [120], і їхня кількість з кожним роком зростає [86; 234]. Більшість тіопептидів проявляють сильну активність проти грамполозитивних бактерій, включаючи MRSA, ванкоміцинрезистентні ентерококи та пеніцилінрезистентні штами *Streptococcus pneumoniae* [192]. Недавні дослідження також довели, що деякі з тіопептидів виявляють активність проти мультирезистентних шпитальних ізолятів, наприклад, тіострептон проти *P. aeruginosa* та *A. baumannii* [172], а також мікрококцин P1 проти *M. tuberculosis* [52].

Структурний аналіз тіопептидів дозволив класифікувати їх як тіазолілпептиди, які складаються з макроциклічного ядра, що містить тіазоли, оксазоли та індоли; дегідроамінокислоти та шестичленний три- або чотиризаміщений азотистий гетероцикл з бічним ланцюгом(ами) [12]. Складна структура цих антибіотиків створює серйозну проблему для їхнього хімічного синтезу, що робить пошук природних тіопептидів актуальним [82]. Виявлення нових тіопептидів дозволить отримати нові препарати з покращеними біологічними або фармакологічними властивостями. Крім того, нові природні продуценти раніше ідентифікованих тіопептидів можуть бути ефективнішими у використанні порівняно з відомими штамми. Спираючись на це, ми спробували виявити продуценти тіопептидних антибіотиків у досліджуваній колекції актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*. Для цього використали мікробний біосенсор *S. lividans* ТК24 рМО16, який заснований на індукційному промоторі *tipAr*, злитому з геном *neo*. Цей промотор контролює експресію гена резистентності *neo* та індукуює появу стійкості до канаміцину *S. lividans* в присутності тіопептидних антибіотиків [146]. Тестування виконували методом агарових блоків, який детально описаний в пункті 2.2.11.

Серед досліджених актиноміцетів ми ідентифікували два ізоляти *Streptomyces* sp. Je 1-79 та *Streptomyces* sp. Je 1-613, які індукували ріст штаму-біосенсора навколо агарових блоків на чашках з 50 мкг/мл канаміцину (рис. 3.15.a). Навколо блоків з газонами решти ізолятів росту біосенсорного штаму не зафіксували. Таким чином, серед 372 ізолятів ми виявили два потенційні продуценти тіопептидних антибіотиків.

Для підтвердження отриманих результатів скринінгу, ми виконали хімічний (дереплікативний) аналіз їхніх вторинних метаболітів. Ізоляти інокулювали в рідке середовище SG та після семи діб вирощування екстрагували вторинні метаболіти рівним об'ємом етилацетату. Наявність сполук, здатних індукувати фенотип Km-резистентності у *S. lividans* ТК24 рМО16, перевіряли шляхом викладання паперових дисків з відповідними екстрактами на газон штаму-

біосенсору. Як і в тесті з агаровими блоками, екстракти ізолятів Je 1-79 і Je 1-613 також індукували ріст штаму-біосенсора (рис. 3.15.б).

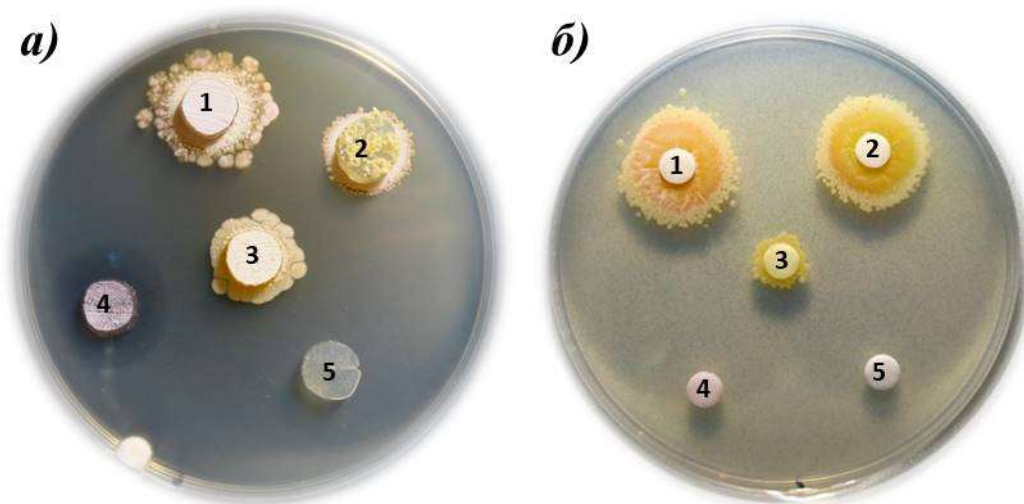


Рис. 3.15. Результати виявлення потенційних продуцентів тіопептидних антибіотиків: *а)* метод агарових блоків; *б)* тестування екстрактів вторинних метаболітів. 1 – ізолят Je 1-79, 2 – ізолят Je 1-613, 3 – позитивний контроль (*S. sioyaensis* NRRL-B5408), 4 – негативний контроль 1 (*S. coelicolor* M145) та 5 – негативний контроль 2 (середовище SG).

Аналіз отриманих екстрактів за допомогою ВЕРХ-МС (рис. 3.16.а) засвідчив наявність піку з Чв 10,1 хв і масою m/z 1146,3484 Да $[M+H]^+$ на хроматограмах обох ізолятів (рис. 3.16.б). Також для цього піку в екстрактах, отриманих з двох ізолятів, були характерними подібні сигнали УФ-поглинання при λ_{\max} 230 нм, 258 нм і 320 нм (рис. 3.16.в). Величина піку вказувала на те, що рівень продукції метаболіту в Je 1-79 був вищим, ніж в Je 1-613. Дереплікативним аналізом моноізотопної маси 1145,3411 цього піку в базі даних DNP ми виявили збіг з тіопептидним антибіотиком берніаміцином А. Також на хроматограмах обох ізолятів виявлено похідне берніаміцину А, а саме берніаміцин В (Чв 11,2 хв і маса m/z 1130,3534 Да $[M+H]^+$), рівень продукування якого був значно нижчим, ніж берніаміцину А.

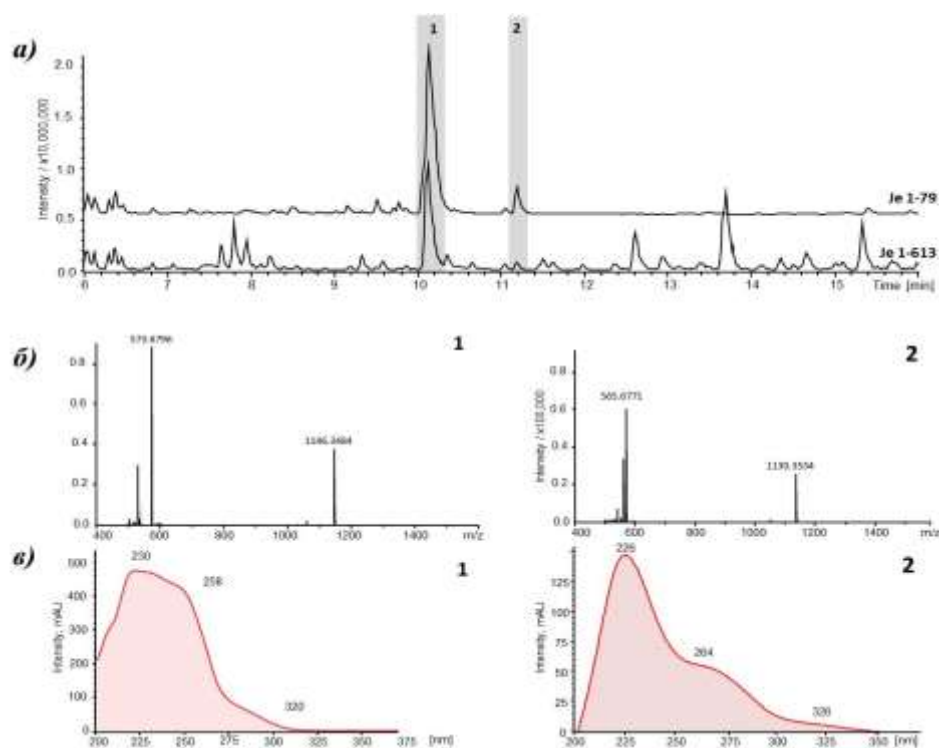


Рис. 3.16. Результати ВЕРХ-МС аналізу вторинних метаболітів *Streptomyces* sp. Je 1-79 і Je 1-613: 1 – бернінаміцин А; 2 – бернінаміцин В; а) ВЕРХ-МС хроматограми екстрактів ізолятів *Streptomyces* sp. Je 1-79 і Je 1-613; б) мас-спектри бернінаміцинів; в) УФ/ВСС-спектри бернінаміцинів.

Зважаючи на складну хімічну структуру тіопептидних антибіотиків та для підтвердження отриманих результатів дереплікації бернінаміцину А, ми додатково виконали фрагментаційний аналіз. Для цього проведено тандемний мас-спектрометричний аналіз (MS2), який дозволяє визначити склад ключових фрагментів, з яких складається молекула. Фрагментація лінійного пептидного бічного ланцюга бернінаміцину А відбулася через розрив NH–CO зв'язку між дегідроаланінами, що призводило до утворення піку іонів масою m/z 1067,41 Да $[M+H]^+$. Також спостерігали утворення піку фрагментного іону масою m/z 1007,46 Да $[M+H]^+$ через розрив зв'язку $CH_2=C-NH$ між Dha II та P_{yr}. Розщеплення системи пептидного кільця шляхом фрагментації пептидних зв'язків CO–NH привело до ідентифікації наступних фрагментів: фрагмент двох амінокислот ОхаВ-DhaIV (m/z 912,28 Да $[M+H]^+$), трьох DhaIV- L-Hyval-ОхаА (m/z 812,29 Да $[M+H]^+$), чотирьох DhaIV-L-Hyval-ОхаА-DhaIII (m/z 743,32 Да $[M+H]^+$) і п'яти

DhaIV-L-Hyval-OxaA-DhaIII-OxaB (m/z 579,27 Да $[M+H]^+$). Також спостерігали фрагмент, що утворився після втрати OH-групи (m/z 1129,43 Да $[M+H]^+$) (рис. 3.17.).

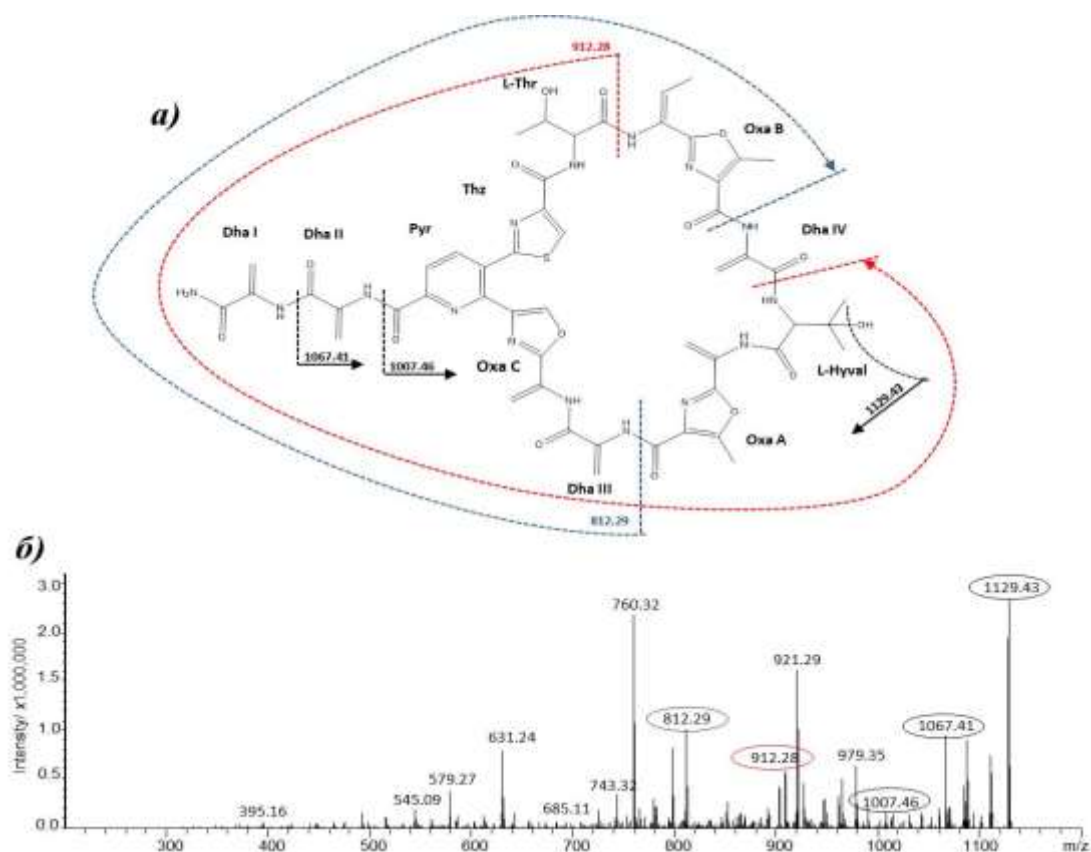


Рис. 3.17. Результати фрагментаційного аналізу бернінаміцину А: а) хімічна формула; б) тандемна мас-спектроскопія. Овалами показано маси іонів-фрагментів, які утворені після фрагментації бернінаміцину А, стрілками показано хімічні структури утворених іонів-фрагментів.

Отримані результати дереплікативного та фрагментаційного аналізів доводять, що ізоляти *Streptomyces* sp. Je 1-79 та *Streptomyces* sp. Je 1-613 продукують бернінаміцини А і В.

Нуклеотидна послідовність кластеру генів біосинтезу бернінаміцину є описаною [131]. Спираючись на це, ми дослідили наявність кластеру генів біосинтезу бернінаміцину А у досліджуваних ізолятів. Оскільки обидва досліджувані природні ізоляти продукують один і той самий тіопептидний антибіотик, ми вирішили секвенувати геном *Streptomyces* sp. Je 1-79, якому властивий вищий рівень синтезу бернінаміцину А. Для цього ми секвенували

геном та задепоновували в японській базі даних ДНК (DNA Data Bank of Japan (DDBJ)), Європейському архіві нуклеотидів (European Nucleotide Archive (ENA)) та базі даних генетичної інформації GenBank з номером доступу JAMGSL000000000. За допомогою веб-сервера antiSMASH в геномі Je 1-79 ми виявили 28 ймовірних кластерів генів вторинного метаболізму, серед яких тіопептидний генний кластер (№ 22) (табл. 3.2.). BLAST-аналіз цього кластеру виявив 93 % подібності з кластером генів берніаміцину А (*ber*) штаму *S. bernensis* UC 5144 (GenBank: KC894738).

Таблиця 3.2.

Передбачувані кластери генів та їхні гомологи, що кодують вторинні метаболіти *Streptomyces* sp. Je 1-79, виявлені з допомогою antiSMASH

Кластер	Тип	Найбільш подібний кластер/МІВіГ BGC-ID	Подібність (%)
1	НРПС, індол	Еритрохелін/ BGC0000349	85
2	Т2ПКС	Кураміцин/ BGC0000215	100
3	НРПС,Т1ПКС		
4	НАРАА	Стенотрицин/ BGC0000431	13
5	CDPS	Тотопотенсамід/ BGC0001807	7
6	ПКС-подібний, бутиролактон	α -ліпоміцин/ BGC0001003	9
7	RiPP-подібний	-	-
8	НРПС-подібний	Аурораміцин/ BGC0001522	16
9	Сидерофор		
10	Бутиролактон, ектоїн	Шовдоміцин/ BGC0001778	64
11	НРПС-подібний	Ехосіде/ BGC0000340	11
12	Терпен	Хопен/ BGC0000663	84
13	НАРАА	-	-
14	LAP, тіопептид	Борелідин/ BGC0000031	6
15	Лантирертид клас III	SarV/ BGC0000551	100
16	Сидерофор	-	-
17	НРПС, НРПС-подібний	Аміцетин/ BGC0000953	8
18	RiPP-подібний	Зорбаміцин/ BGC0001058	4
19	Невідомий	Гігроміцин/ BGC0000699	6
20	Ектоїн	Ектоїн/ BGC0000853	100
21	Меланін	Меланін/ BGC0000910	100
22	Тіопептид	Берніаміцин/ BGC0001472	93
23	Бутиролактон		
24	Т2ПКС	Овідоміцин/ BGC0000253	45
25	Терпен	Гліциноцин/ BGC0000379	4
26	Терпен	Геосмін/ BGC0001181	100
27	НРПС	-	-
28	Терпен	2-метиллісоборнеол/ BGC0000658	100

Усі гени ідентифікованого *ber*-подібного кластеру з геному *Streptomyces* sp. Je 1-79 виявили високий рівень схожості з відповідними генами *ber* кластера *S. bernensis* UC 5144, а їхня генно-кластерна організація була ідентичною. В обох кластерах генів біосинтезу бернінаміцину А по краях містяться рибосомні та трансляційно асоційовані білки, а також ацилтрансфераза (рис. 3.18). Високий рівень подібності порівнюваних кластерів забезпечували високі відсотки подібності структурного гена *berA* (100 %), що кодує попередник пептиду BerA, а також генів *berB* (83 %), *berC* (86 %), та *berD* (75 %), які, ймовірно, беруть участь у формуванні макроциклу [131].



Gene in Je 1-79	Гомологи в <i>ber</i> кластері	Відсоток покриття	Відсоток подібності
Orf 1	рибосомний білок S12	100	100
Orf 2	рибосомний білок S7	100	97
Orf 3	фактор елонгації G	100	92
Orf 4	фактор елонгації Tu	100	96
Orf 5	<i>berE1</i>	99	81
Orf 6	<i>berE2</i>	100	81
Orf 7	<i>berG1</i>	100	78
Orf 8	<i>berG2</i>	100	86
Orf 9	<i>berD</i>	100	75
Orf 10	<i>berA</i>	100	100
Orf 11	<i>berB</i>	100	83
Orf 12	<i>berC</i>	79	86
Orf 13	<i>berH</i>	82	74
Orf 14	<i>berI</i>	98	86
Orf 15	<i>berJ</i>	98	79
Orf 16	ацил трансфераза	83	58

Рис. 3.18. Результати порівняльного аналізу кластерів генів біосинтезу, що кодують бернінаміцин А у *S. bernensis* UC 5144 (вгорі) і *Streptomyces* sp. Je 1-79 (внизу).

Хоча ізоляти *Streptomyces* sp. Je 1-79 і Je 1-613 продукували один і той самий тіопептидний антибіотик, морфологічно вони відрізнялися (рис. 3.19). Це спонукало нас дослідити їхню філогенію. Ми детально проаналізували та порівняли нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК обох ізолятів. Як видно з Рис. 3.20., ці ізоляти утворюють дві філогенетично віддалені клади та жоден з них не групувався з вибраними продуцентами тіопептидів. Варто зазначити, що нам не вдалося знайти нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК продуцента бернінаміцину *S. bernensis* UC 5144. Таким чином, ми не можемо говорити про філогенетичну віддаленість чи спорідненість між продуцентом бернінаміцину та нашими ізолятами. Проте, ми можемо припустити, що ізоляти *Streptomyces* sp. Je 1-79 і Je 1-613 можуть бути філогенетично різними між собою. Однак, філогенетичний аналіз на основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК недостатній, щоб відокремити близькоспоріднені види, особливо в межах роду *Streptomyces*.

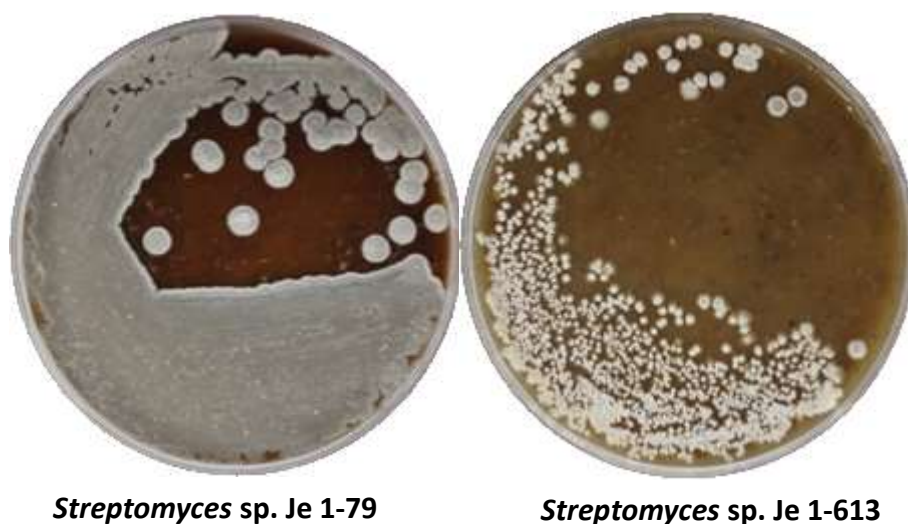


Рис. 3.19. Морфологія виявлених продуцентів бернінаміцинів А і В після вирощування на агаризованому модифікованому ISP-3 середовищі протягом 14 діб при $t=28$ °C.

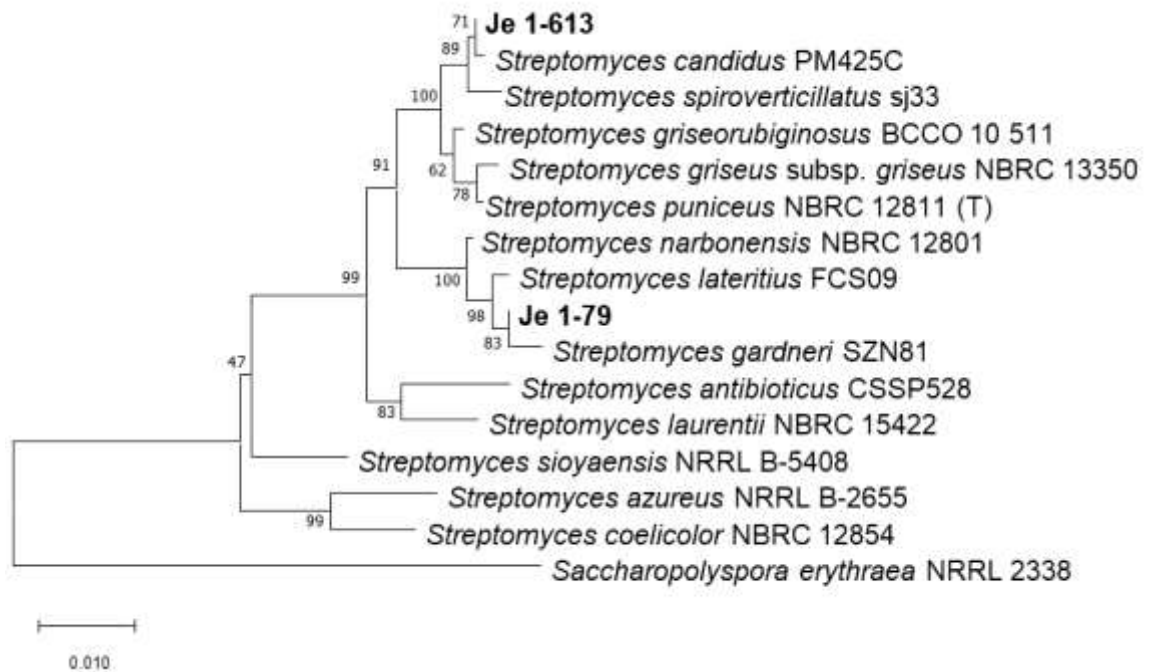


Рис. 3.20. Філогенетичне дерево на основі послідовностей генів 16S рРНК ізолятів Je 1–79 і Je 1–613 (виділені жирним), їхніх найближчих сусідів, кількох відомих продуцентів тіопептидів і вибраних типових штамів стрептоміцетів. *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 використовували для укорінення дерева. Смужка вказує на 0,01 заміни на нуклеотидну позицію.

Для отримання вищої роздільної здатності філогенетичних зв'язків видів у межах роду або родів у родині наразі широко використовується метод мультилокусного аналізу нуклеотидних послідовностей генів (англ. Multilocus sequence analysis (MLSA)). У дослідженнях MLSA часткові послідовності генів, що кодують білки зі збереженими функціями (гени “домашнього господарювання”), використовують для створення філогенетичних дерев і подальшого виведення філогенії [68; 73]. Для MLSA аналізу ми отримали часткові послідовності п'яти генів “домашнього господарювання” ізолятів Je 1-79 і Je 1-613, а саме *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* та *trpB*. BLAST-аналіз отриманих послідовностей цих генів виявив, що найближчими родичами Je 1-79 були штам *S. exfoliatus* A1013Y (подібності послідовності генів *rpoB* і *gyrB* на 98,89 % і 98,55 %, відповідно), штам *S. exfoliatus* AS 4.1407 (98,64 % подібності послідовності гена *atpD*), штам *S. omiyaensis* NRRL B-1587 (96,63 % подібність послідовності гена

recA) та штам *S. cacaoi. asoensis* NRRL B-16592 (97,2 % подібності послідовностей гена *trpB*). Найспорідненішими штамми до Je 1-613 були *S. spiroverticillatus* NBRC 12821 (89,71% подібності послідовності гена *gyrB*), штам *S. candidus* NRRL ISP-5151 (99,32% і 98,41% подібності генів *atpD* і генів *recA* , відповідно), штам *S. griseoluteus* NRRL B-1315 (94,02% подібності послідовностей гена *trpB*) та *Streptomyces* sp. Doro_SunPrairie_70 (97,96% подібності послідовностей гена *rpoB*). Додатково нуклеотидні послідовності генів “домашнього господарювання” об’єднали наступним чином: *atpD* (496 п.н.) – *gyrB* (441 п.н.) – *recA* (504 п.н.) – *rpoB* (540 п.н.) – *trpB* (567 п.н.). Утворені конкатеновані послідовності обох ізолятів використали для попарного вирівнювання. Виявили, що послідовності генів “домашнього господарювання” ізолятів *Streptomyces* sp. Je 1-79 і 1-613 ідентичні на 89,3% (рис. 3.21.). Такий відсоток ідентичності між цими послідовностями вказує на філогенетичну відмінність досліджуваних ізолятів. Ба більше, попарна еволюційна відстань для цих ізолятів, визначена за аналізом утворених конкатенованих послідовностей, становить 0,108, що значно вище 0,007 (що відповідає 70% ДНК-ДНК гібридизації) та перевищує поріг для визначення видів [178]. Результати філогенетичного аналізу *Streptomyces* sp. Je 1-79 та *Streptomyces* sp. Je 1-613, які продукують бернінаміцин А, доводить їхню значну генетичну відмінність та вказує на те, що вони з високою імовірністю належать до різних видів роду *Streptomyces*.

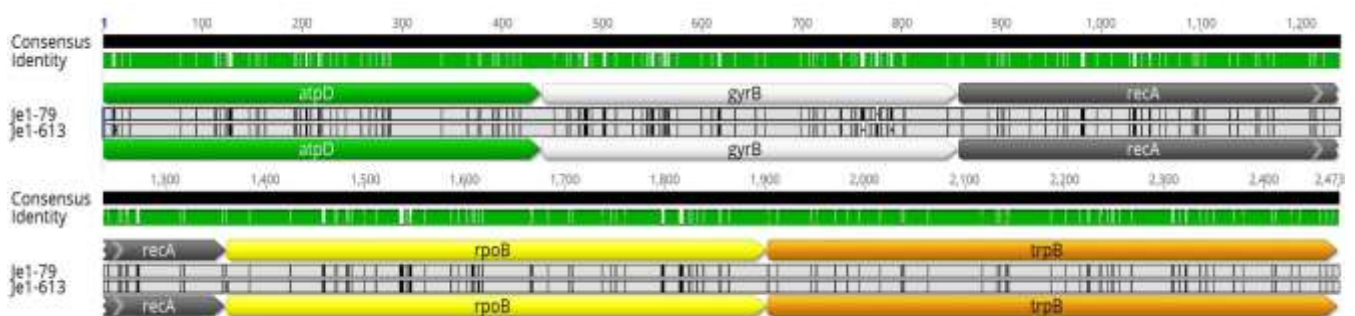


Рис. 3.21. Попарне вирівнювання конкатенованих нуклеотидних послідовностей генів “домашнього господарювання” ізолятів *Streptomyces* sp. Je 1-79 і *Streptomyces* sp. Je 1-613.

Перше застосування біосенсора *S. lividans* TK24 pMO16 для скринінгу природних продуцентів тіопептидних антибіотиків дозволило виявити два потенційні продуценти. Використовуючи комбінований хімічний аналіз вторинних метаболітів та аналіз даних секвенування генома ми довели, що ізоляти *Streptomyces* sp. Je 1-79 і *Streptomyces* sp. Je 1-613 продукують тіопептидні антибіотики бернінаміцин А і В. Детальна філогенетична характеристика з використанням MLSA дозволила з високою вірогідністю припустити, що обидва продуценти належать до різних видів роду *Streptomyces*. Ізолят *Streptomyces* sp. Je 1-79 має високий рівень синтезу бернінаміцину А і може бути розглянутий як перспективний продуцент чи платформа для синтезу тіопептидних антибіотиків.

3.2.2. Скринінг продуцентів антибіотиків-інгібіторів синтезу пептидоглікану

Стрімкий розвиток MDR у патогенних мікроорганізмів викликає глобальне занепокоєння. Особливу увагу надають розвитку резистентності у грампозитивних бактерій, зокрема MDR штами *S. pneumoniae* та MRSA, які спричиняють в 20 разів більше інфекцій, ніж усі MDR грамнегативні бактерії разом узяті [35]. Одним з ефективних знарядь боротьби з інфекціями, що спричиняють грампозитивні бактерії, є глікопептидні антибіотики. Вони є важливим класом терапевтичних засобів, які використовують для лікування інфекційних захворювань та часто є антибіотиками “останньої надії” [216]. Проте, в результаті деякого періоду застосування в клінічній практиці почали виникати стійкі до цих антибіотиків форми бактерій [208]. Тому, потреба в потужних антибіотиках, які б могли лікувати стійкі грампозитивні інфекції, не втрачає актуальності.

Для направленого скринінгу потенційних продуцентів антибіотиків інгібіторів пептидоглікану застосували мікробний біосенсор на основі двокомпонентної системи LiaRS *B. subtilis* HB09050, в якому ген *lacZ* є злитий з промотором *liaI* (*liaIp*) [135]. Штам *B. subtilis* HB0950 синтезує β -галактозидазу у

відповідь на індукцію *lialp* антибіотиками, які пригнічують синтез клітинної стінки у бактерій, що веде до утворення синього ореолу у сублетальних концентраціях, за наявності в середовищі X-gal [48]. Утворення синього ореолу відбувається в результаті ензиматичного розщеплення X-gal з утворенням галактози та 5-бромо-4-хлоро-3-гідроксиіндолу. Останній в подальшому спонтанно димеризується та окислюється до 5,5'-дибром-4,4'-дихлор-індиго – нерозчинної сполуки інтенсивного синього кольору. Як позитивний контроль використали штам *A. teichomyceticus* ATCC 31121. Ця культура продукує глікопептидний антибіотик тейкопланін, який пригнічує синтез клітинної стінки у бактерій [213].

Ідентифіковано 31 ізолят, які індукували утворення ореолу синього забарвлення біосенсорним штамом (рис. 3.22.). Це може вказувати на їхню потенційну здатність продукувати біоактивні метаболіти, які можуть пригнічувати синтез клітинної стінки.

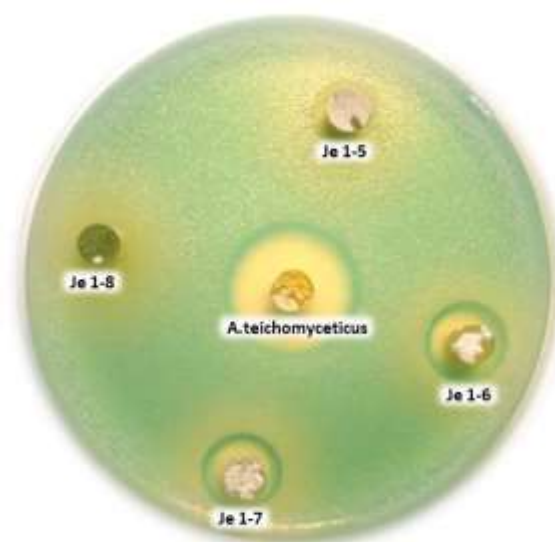


Рис. 3.22. Результати тестування ізолятів ризосфери *J. excelsa* на здатність продукувати інгібітори синтезу пептидоглікану.

Серед ізолятів, які індукували утворення синього ореолу штаму-біосенсора, ми виділили *Streptomyces* sp. Je 1-6. Навколо агарового блоку з цим ізолятом зона пригнічення штаму-біосенсора з синім ореолом була найбільш вираженою у

порівнянні з іншими ізолятами. Крім того, цей ізолят продемонстрував потужну антагоністичну активність проти грампозитивних бактерій (Додаток Б, Таблиця Б1.)

Перш за все ми здійснили філогенетичний аналіз ізоляту Je 1-6. Як видно з філогенетичного дерева, яке включало нуклеотидні послідовності генів 16S рРНК ізоляту Je 1-6, шести штамів, які демонстрували найвищу подібність та декількох репрезентативних штамів стрептоміцетів, досліджуваний ізолят утворює спільну кладу з штамом *S. tubercidicus* 14241 (EF371435) в межах щільної кледи стрептоміцетів (рис. 3.23.).

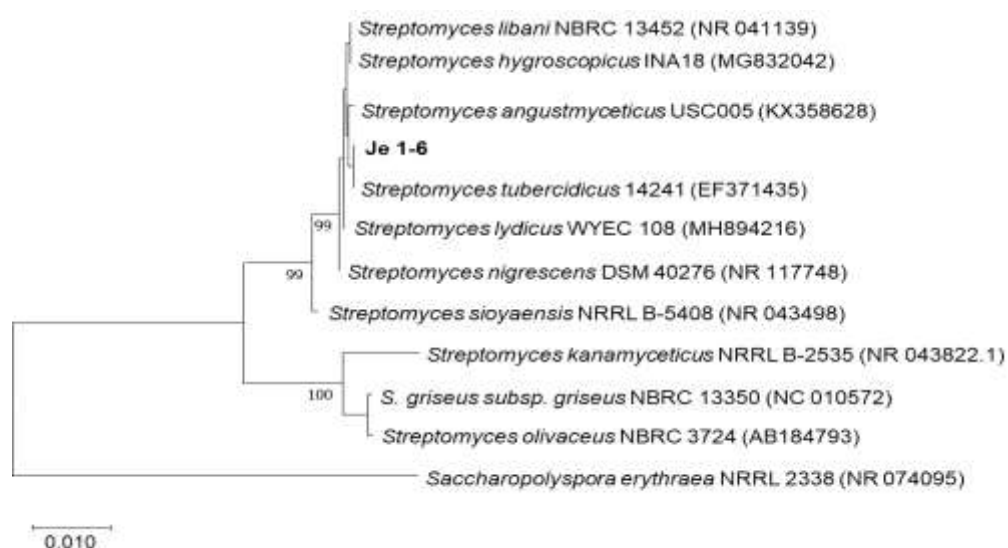


Рис. 3.23. Філогенетичне дерево на основі послідовностей гена 16S рРНК, яке показує еволюційні взаємодії штаму Je 1-6 зі спорідненими видами роду *Streptomyces*. Для закорінення дерева використано послідовність гена 16S рРНК *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338. Bar – 0,01 заміни на нуклеотидну позицію.

Для метаболічного профілювання досліджуваний ізолят культивували глибинно в середовищах DNPM і SG. Метаболіти екстрагували окремо з культуральної рідини рівним об'ємом етилацетату та біомаси сумішшю ацетон:метанол (1:1). Отриманні екстракти випаровували та концентрували. Екстракти розділяли використовуючи ВЕРХ-МС, дані збирали в позитивному режимі іонізації в масовому діапазоні 200-2000 *m/z*. На отриманих хроматограмах ідентифікували чотири основних піки вторинних метаболітів із молекулярними

масами m/z 841,53198 Да $[M+H]^+$, 855,54816 Да $[M+H]^+$, 825,53448 Да $[M+H]^+$ та 839,55096 Да $[M+H]^+$. Моноізотопні маси цих піків використали для дереплікації в базі даних природних сполук DNP. При цьому використали такі параметри, як точна молекулярна маса, спектр поглинання та джерело виділення. В результаті дереплікації нам вдалося ідентифікувати сполуки, що утворюють ці піки, як антибіотик лідикаміцин та його конженери: 30-деметиллідинаміцин, 30-деметил-8-дезоксилідикаміцин та 8-дезоксилідикаміцин (рис. 3.24.).

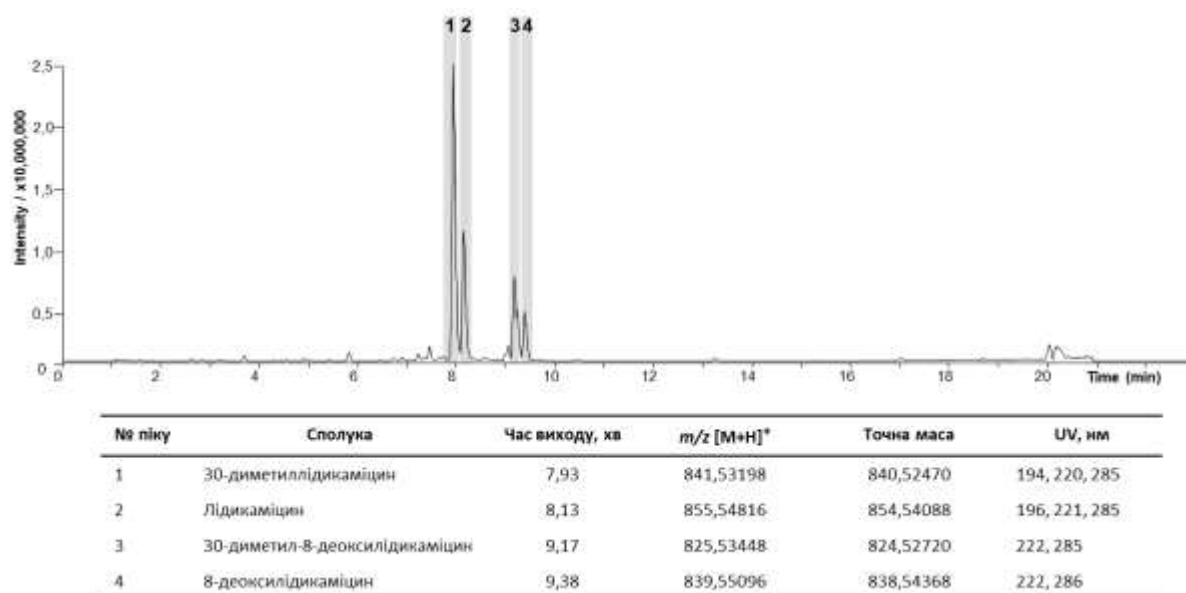


Рис. 3.24. Результати ВЕРХ-МС аналізу неочищеного екстракту ізоляту *Streptomyces* sp. Je 1-6. Ідентифіковані сполуки (піки) позначено цифрами, їхні характеристики наведені в таблиці.

В результаті фрагментаційного аналізу вторинних метаболітів з допомогою тандемної мас-спектрометрії виявили іонний пік фрагмента (m/z 728,52 Да $[M+H]^+$), який був отриманий шляхом елімінації α -карбонілтетрамінової кислоти ($C_5H_4NO_3$) (рис. 3.25.). Також, наявність іонного піку фрагмента (m/z 742,45 Да $[M+H]^+$), вказує на відщеплення піролідин-1-карбоксаміду ($C_5H_{11}N_3$). Крім відщеплення циклізованих структур молекули лідикаміцину по краях ми також спостерігали утворення іонних піків фрагментів m/z 240,15 Да $[M+H]^+$, m/z 310,20 Да $[M+H]^+$ та m/z 394,26 Да $[M+H]^+$, які утворюються шляхом фрагментації полікетидного ланцюга. До того ж, ми виявили іонні піки фрагментів, що

утворюються після втрати OH-груп (m/z 837,68 Да $[M+H]^+$, m/z 819,67 Да $[M+H]^+$, m/z 801,66 Да $[M+H]^+$ та m/z 783,65 Да $[M+H]^+$).

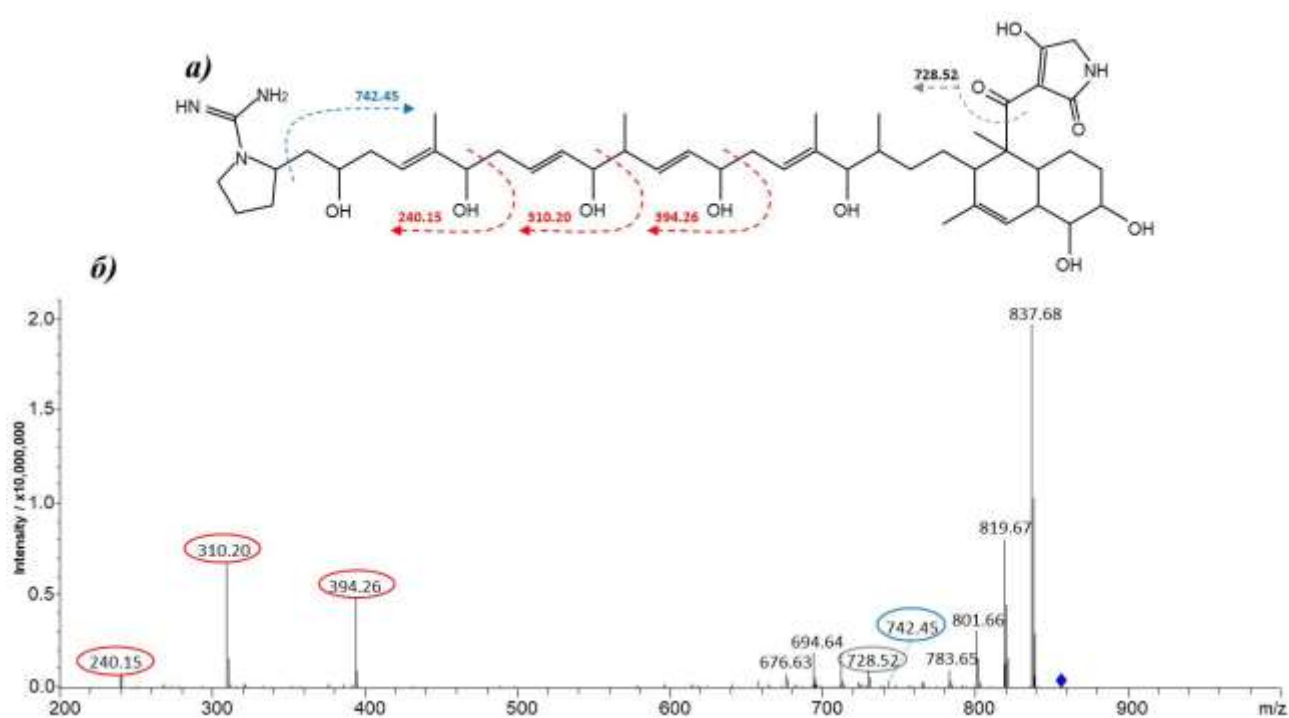


Рис. 3.25. Результати фрагментаційного аналізу лідикаміцину: а) хімічна формула лідикаміцину, стрілками показано хімічні структури утворених іонів-фрагментів; б) результати тандемної мас-спектроскопії лідикаміцину. Овалами показано маси іонів-фрагментів, які утворені після фрагментації лідикаміцину.

Одержані результати дереплікації і фрагментації вторинних метаболітів доводять здатність штаму *Streptomyces* sp. Je 1-6 продукувати лідикаміцини. Дані фрагментаційного аналізу лідикаміцину узгоджуються з раніше опублікованими [77].

Таким чином, застосування біосенсорного штаму *B. subtilis* HB09050 дозволило виявити продуцента потужних антибактерійних антибіотиків лідикаміцинів. Це відкриває перспективи для детального дослідження решти природних ізолятів, які індукували функціонування двокomпонентної системи LiaRS, з метою пошуку нових антибіотиків-інгібіторів синтезу клітинної стінки бактерій.

3.2.3. Скринінг продуцентів макролідних антибіотиків полікетидної природи памамцінінів

Памамцініни – полікетидні природні антибіотики з молекулярною масою від 579 до 663 Да, які вперше були виділені зі штаму *S. alboniger* ATCC 21461 [138]. З огляду на використання, памамцініни демонструють низку цікавих фармакологічних властивостей. Наприклад, у актиноміцетів вони індують перехід від субстратного до повітряного міцелію [147]. Ці сполуки виявляють високий рівень активності проти грибів і грампозитивних бактерій, у тому числі проти *S. aureus* і мультирезистентних клінічних ізолятів *M. tuberculosis* [117]. Через свої багатообіцяючі активності памамцініни привертають значний інтерес та стимулюють дослідників до подальших досліджень. Проте, через складну хімічну структуру, хімічний синтез памамцінінів є складним і дорогавартісним. З іншого боку, рівень мікробної продукції цього антибіотика, який може мати до 16 різних похідних, є недостатнім, щоб в повній мірі дослідити їхні властивості [69]. Зважаючи на структурне різноманіття та властивості памамцінінів, пошук нових продуцентів може привести до виявлення нових похідних чи ідентифікації продуцентів “важких” памамцінінів, які мають кращу біологічну активність.

Для виявлення потенційних продуцентів памамцінінів у досліджуваній колекції природних ізолятів актиноміцетів використали мікробний біосенсор *S. albus* ΔpseB4 CD10RO1. Принцип його роботи ґрунтується на взаємодії передбачуваного гена експортера (*pamW*) і транскрипційного фактору родини TetR (TFR, *pamR2*), які разом забезпечують експорт памамцініну у відповідь на його внутрішньоклітинну концентрацію (рис. 3.26.а). За відсутності памамцініну білок PamR2 зв’язується з промотором гена *pamW*, пригнічуючи його транскрипцію (рис. 3.26.б); за присутності памамцініну білок PamR2 вивільняється з промотора гена *pamW*, що призводить до активації його транскрипції (рис. 3.26.в) [174].

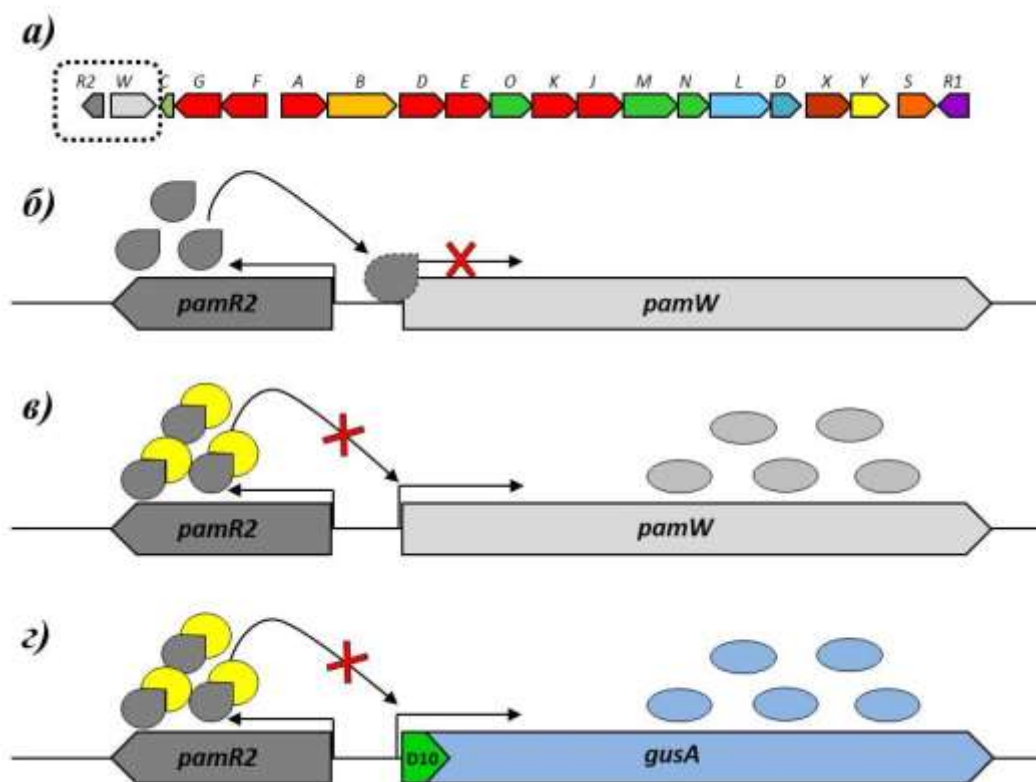


Рис. 3.26. Схематичне зображення функціонування біосенсора для скринінгу памамцінів: *a)* кластер генів біосинтезу памамцінів; *б)* взаємодія гена експортера (*pamW*) і транскрипційного фактору *pamR2* за відсутності памамцінів; *в)* взаємодія гена *pamW* і транскрипційного фактору *pamR2* за присутності памамцінів; *г)* схема біосенсора.

Як репортерний ген в штамі-біосенсорі використано ген β -глюкуронідази *gusA*, клонований замість гена *pamW* під контролем синтетичного промотора D10 [196], що був об'єднаний з одним оператором *PamR2* (рис. 3.26.г). Таким чином, за присутності памамціну штамі-біосенсор починає експресувати ген *gusA*, що відповідає за синтез β -глюкуронідази, яка в свою чергу перетворює безбарвний субстрат X-gluc у сполуку синього кольору 5,5'-дибром-4,4'-дихлор-індіго. Ми виявили 26 ізолятів актиноміцетів, навколо блоків з якими штамі-біосенсор *S. albus* Δ pseB4 CD10RO1 утворював характерний синій ореол (рис. 3.27.).



Рис. 3.27. Результати скринінгу продуцентів памаміцинів серед ізолятів ризосфери *J. excelsa*.

Під час наступного кроку досліджень ми виконали дереплікативний аналіз вторинних метаболітів одного з потенційних продуцентів памаміцинів. Найбільш виразний ореол синього кольору утворив ізолят Je 1-529. Культуру вирощували в рідкому середовищі SGG для екстракції та аналізу продукції памаміцинів. Екстрагували рівним об'ємом етилацетату з культуральної рідини. Отриманий екстракт вторинних метаболітів випаровували, розчиняли у метанолі та аналізували, використовуючи ВЕРХ-МС.

Зважаючи на те, що аналіз мас сполук здійснювали в позитивному режимі іонізації, дереплікацію памаміцинів в отриманих хроматограмах здійснювали шляхом екстракції молекулярної маси памаміцинів з додаванням молярної маси іону гідрогену (1,0079 г/моль). Таким чином, ми намагалися екстрагувати всі памаміцини: памаміцин 579 (точна маса 579,4135 Да; маса екстракції $580,4214 \pm 0,05$ Да), памаміцин 593 (точна маса 593,4292 Да; маса екстракції $594,4371 \pm 0,05$ Да), памаміцин 607 (точна маса 607,4448 Да; маса екстракції $608,4527 \pm 0,05$ Да), памаміцин 621 (точна маса 621,4605 Да; маса екстракції $622,4684 \pm 0,05$ Да), памаміцин 635 (точна маса 635,4761 Да; маса екстракції $636,484 \pm 0,05$ Да) та памаміцин 649 (точна маса 649,4918 Да; маса екстракції $650,4997 \pm 0,05$ Да).

Також, звертали увагу і на Чв памамцінів, який повинен бути ідентичним порівняно із контролем.

В результаті аналізу хроматограми екстракту вторинних метаболітів ізоляту Je 1-529 виявили 4 піки, які дереплікували як памамціни 579, 593, 607 та 621 (рис. 3.28.).

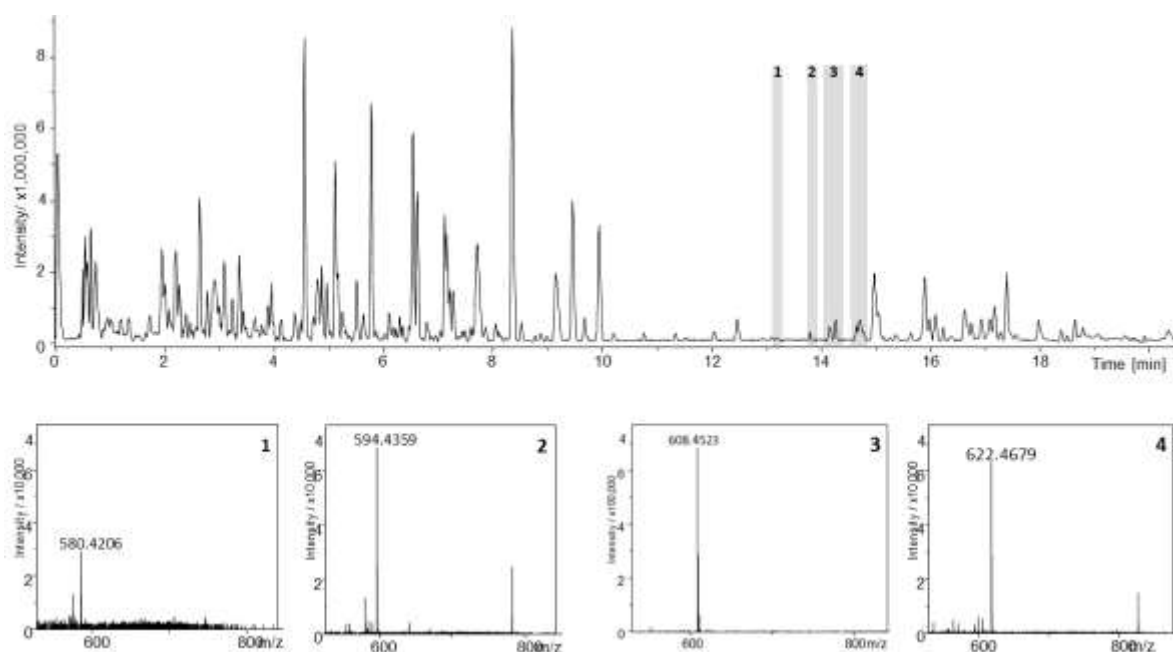


Рис. 3.28. Результати ВЕРХ-МС аналізу екстракту вторинних метаболітів ізоляту Je 1-529. Цифрами показано ідентифіковані памамціни 579 (1), 593 (2), 607 (3) та 621 (4).

В досліджуваному ізоляті виявили похідні “легких” памамцінів, серед яких памамціни 607 та 621 утворювали найбільші масові піки на хроматограмі. Однак, ми не виявили жодного піку, який відповідає “важким” похідним памамцінам. Досліджуваний ізолят може не продукувати “важкі” похідні памамцінів або їхня кількість є недостатньою для виявлення, оскільки ці похідні становлять менше 5 % від загального пулу памамцінів [69].

Одержані результати вказують на наявність в досліджуваній колекції актиноміцетів ймовірних продуцентів памамцінів. Детальне дослідження яких

може призвести до виявлення штаму-надпродуцента чи нових похідних цих антибіотиків.

Підсумки до розділу

Здійснено скринінг продуцентів відомих класів антибіотиків, використовуючи специфічні мікробні біосенсорні системи. Виявлено два стрептоміцети (Je 1-79 та Je 1-613) продуценти тіопептидних антибіотиків бернінаміцинів, використовуючи біосенсор *S. lividans* TK24 pMO16 для скринінгу тіопептидів. Ідентифікацію бернінаміцинів підтвердили виявленням кластеру генів біосинтезу в ізоляті *Streptomyces* sp. Je 1-79, який на 93% подібний з *ber* кластером, отриманим з *S. bernensis*. Використовуючи біосенсор *B. subtilis* HB09050, виявлено 31 потенційний продуцент антибіотиків, які здатні інгібувати синтез пептидоглікану. Серед них був ізолят Je 1-6, в екстракті якого ідентифікували антибіотик лідикаміцин та його похідні. Використання біосенсора *S. albus* ΔpseB4 CD10RO1 для скринінгу памаміцинів привело до виявлення 26 потенційних продуцентів памаміцинів. Детальний аналіз екстрактів вторинних метаболітів ізоляту *Streptomyces* sp. Je 1-529 привів до ідентифікації памаміцинів 579, 593, 607 та 621.

Матеріалами цього розділу опубліковано в статтях [174; 217; 221], патентах [247; 257] та тезах конференцій [249; 255].

3.3. Нові нафтохінон подібні меротерпеноїди фурахіноцини K та L

Меротерпеноїди - це великий клас природних сполук, які утворюються гібридним типом біосинтезу, що включає полікетидний чи неполікетидний і терпеноїдний біосинтези [148]. Ці сполуки мають велике структурне розмаїття, що складається з пренільної одиниці, з'єднаної з фенольною похідною до більш складних меротерпеноїдів, які складаються з функціональних вуглецевих ланцюгів. Варіативність спостерігається не лише в нетерпеноїдному компоненті структури, а також у довжині ланцюга терпеноїду та режимі, у якому терпеноїдна частина молекули піддається циклізації [244]. Ці гібридні сполуки в основному продукують гриби та морські мікроорганізми, деякі представники

меротерпеноїдів виявляли в рослинних екстрактах. Значну кількість представників класу меротерпеноїдів виділили з морських і ґрунтових бактерій роду *Streptomyces* [143].

Зважаючи на значну структурну різноманітність, для меротерпеноїдів характерний широкий спектр біологічної активності: протипухлинна, антибактеріальна, протигрибкова, протималярійна, цитотоксична, антиоксидантна, анти-ВІЛ, нейропротекторна тощо [72]. Такий різноманітний та багатообіцяючий спектр біологічних активностей привертає увагу до вивчення цього класу природних сполук.

У цьому підрозділі ми описуємо виявлення, визначення хімічної структури, кластера генів біосинтезу, ймовірну схему біосинтезу та біологічну активність двох нових меротерпеноїдів фурахіноцинів K і L, які продукує ізолят *Streptomyces* sp. Je 1-369, виділений з ризосфери *J. excelsa*.

3.3.1. Ідентифікація та визначення хімічної структури нових фурахіноцинів

В результаті аналізу антибіотичної активності ізолятів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* ми виявили *Streptomyces* sp. Je 1-369, який інгібував ріст більшості використаних тест-культур грампозитивних, грамнегативних бактерій, а також грибів (див. Додаток Б). Це може бути зумовлено продукуванням сполук із широким спектром дії або низки антимікробних сполук. Для з'ясування природи вторинних метаболітів, які можуть забезпечувати антибіотичну активність, ізолят Je 1-369 ферментували у рідкому середовищі SG. Екстрагування вторинних метаболітів виконували на сьому добу росту. З надосадової рідини метаболіти екстрагували етилацетатом, з біомаси – сумішшю ацетон : метанол (1 : 1). В результаті аналізу ВЕРХ-МС хроматограм із високою роздільною здатністю сирих екстрактів цього штаму ми виявили кілька піків сполук. Ці піки ідентифіковані на хроматограмах при обох методах екстракції, однак їхній рівень в етилацетатних екстрактах з культуральної рідини був значно вищим. Тому далі аналізували лише ці екстракти.

Сполука **1** утворювала пік з ЧВ 14,7 хв і m/z 385,2005 Да $[M+H]^+$, сполука **2** утворювала пік з ЧВ 15,3 хв і m/z 443,2187 Да $[M+H]^+$ та сполука **3** утворювала пік з ЧВ 13,4 хв та m/z 371,1843 Да $[M+H]^+$ (рис. 3.29.а). Максимум поглинання цих сполук в УФ/ВСС-спектрі спостерігали при λ_{max} 226, 264, 300 та 408 нм (**1**), λ_{max} 228, 278, 328 і 504 (**2**) та λ_{max} 224, 268, 298 та 410 (**3**) (рис. 3.29.б). Подібність між спектрами поглинання ідентифікованих сполук може вказувати на їхню структурну схожість.

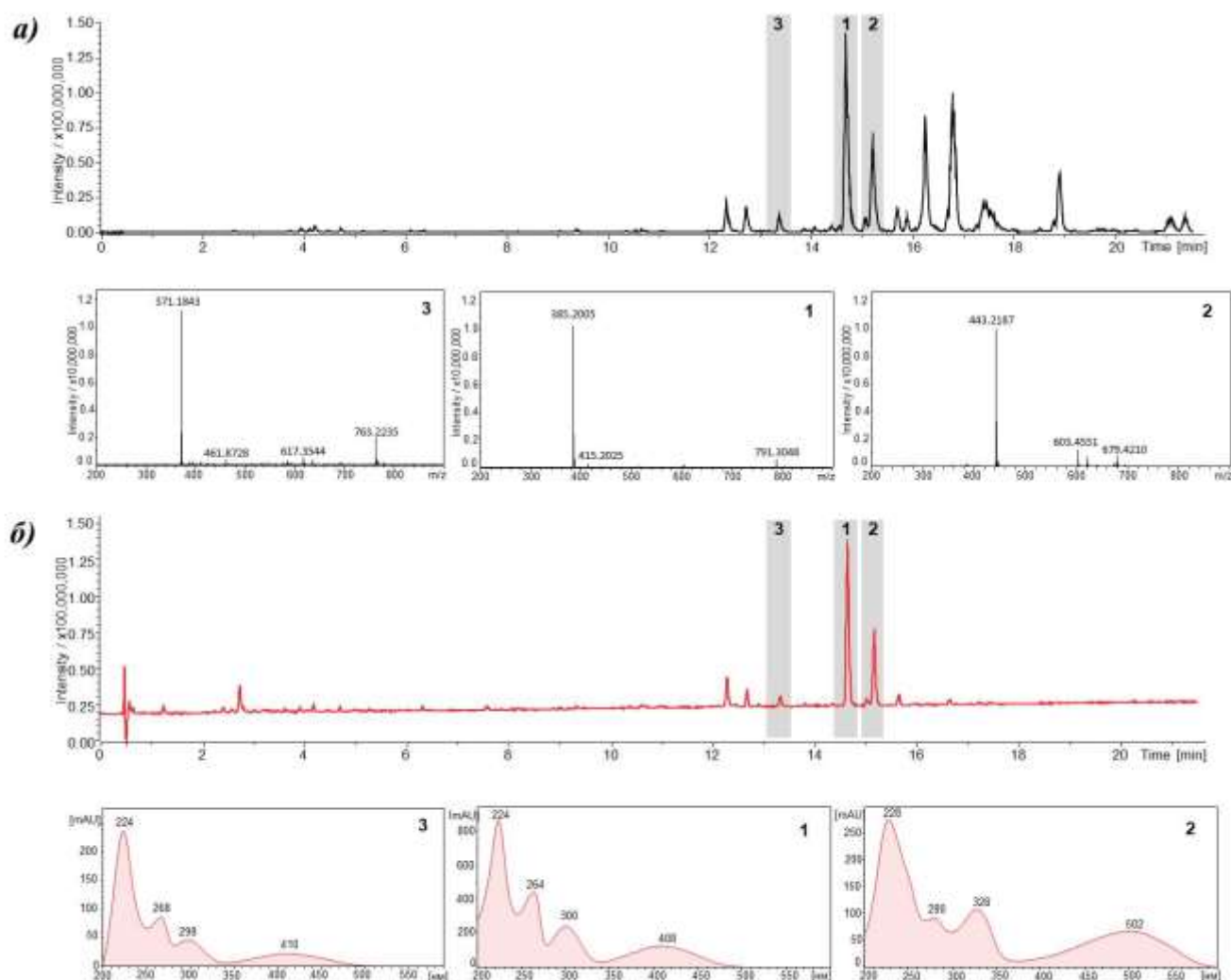


Рис. 3.29. Результати ВЕРХ аналізу екстракту вторинних метаболітів ізоляту *Streptomyces* sp. 1-369: а) ВЕРХ-МС хроматограма екстракту; б) ВЕРХ-УФ/ВСС хроматограма екстракту. Виявлені піки та їхні масові та УФ/ВСС-спектри позначені цифрами знизу відповідних хроматограм.

В результаті дереплікативного аналізу ідентифікованих моноізотопних мас 384,1929 Да (1) та 442,2114 Да (2) у базі даних DNP ми не виявили збігів. Проте, на відміну від сполук 1 та 2, сполуку 3 з моноізотопною масою 370,177 Да ми змогли дереплікувати в базі даних DNP та визначили її як меротерпеноїд фурахіноцин С. Враховуючи подібність між спектрами поглинання та невелику різницю між масами сполук можна припустити, що сполуки 1 та 2 можуть бути новими представниками родини нафтохіноноподібних сполук – фурахіноцинів.

Для визначення структури виявлених потенційно нових сполук необхідною умовою є нагромадження і очистка їхньої достатньої кількості. З цією метою *Streptomyces* sp. Je 1-369 вирощували в 10 л середовища SG. Екстракцію вторинних метаболітів здійснювали з надосадової рідини, використовуючи рівний об'єм етилацетату. Екстракт випарювали та концентрували. В результаті чого, отримали 1,8 г сухого етилацетатного екстракту.

Сполуки 1 та 2 очищали за три етапи: I) нормально-фазова хроматографія з використанням колонки з силікагелем; II) ексклюзивна хроматографія, в колонці з сефадексом (LH-20); III) семі-препаративна ВЕРХ. Комбінація різних способів розділення дає змогу отримати очищені сполуки високої якості. На першому етапі розділення екстракту, елюювання сполук відбувається через полярність/не полярність рухомої фази. Другий етап дозволяє розділяти сполуки, що відрізняються розмірами та їхньою здатністю проникати в пори сефадексу. Завершальний етап (етап доочистки) дозволяє очищати пік, що утворює сполука в режимі реального часу.

На першому етапі екстракт розділили на 248 фракцій. З допомогою ВЕРХ-МС ми змогли виявити сполуку 1 у фракціях № 2-15 з найвищою інтенсивністю у фракції № 9, а сполуку 2 – у фракціях № 17-21 з найвищою інтенсивністю у фракції № 19. Фракції з кожною сполукою об'єднували та концентрували в метанолі. Після першого етапу очищення отримано 86 мг екстракту з сполукою 1 з m/z 385,2005 Да $[M+H]^+$ та 54 мг з сполукою 2 m/z 443,2187 Да $[M+H]^+$.

На другому етапі очищення метанольні концентрати кожної сполуки розділили на 120 фракцій. Застосовуючи ту ж саму послідовність дій ми змогли отримати 18,4 мг екстракту зі сполукою **1** та 8,9 мг зі сполукою **2** (рис. 3.30.).

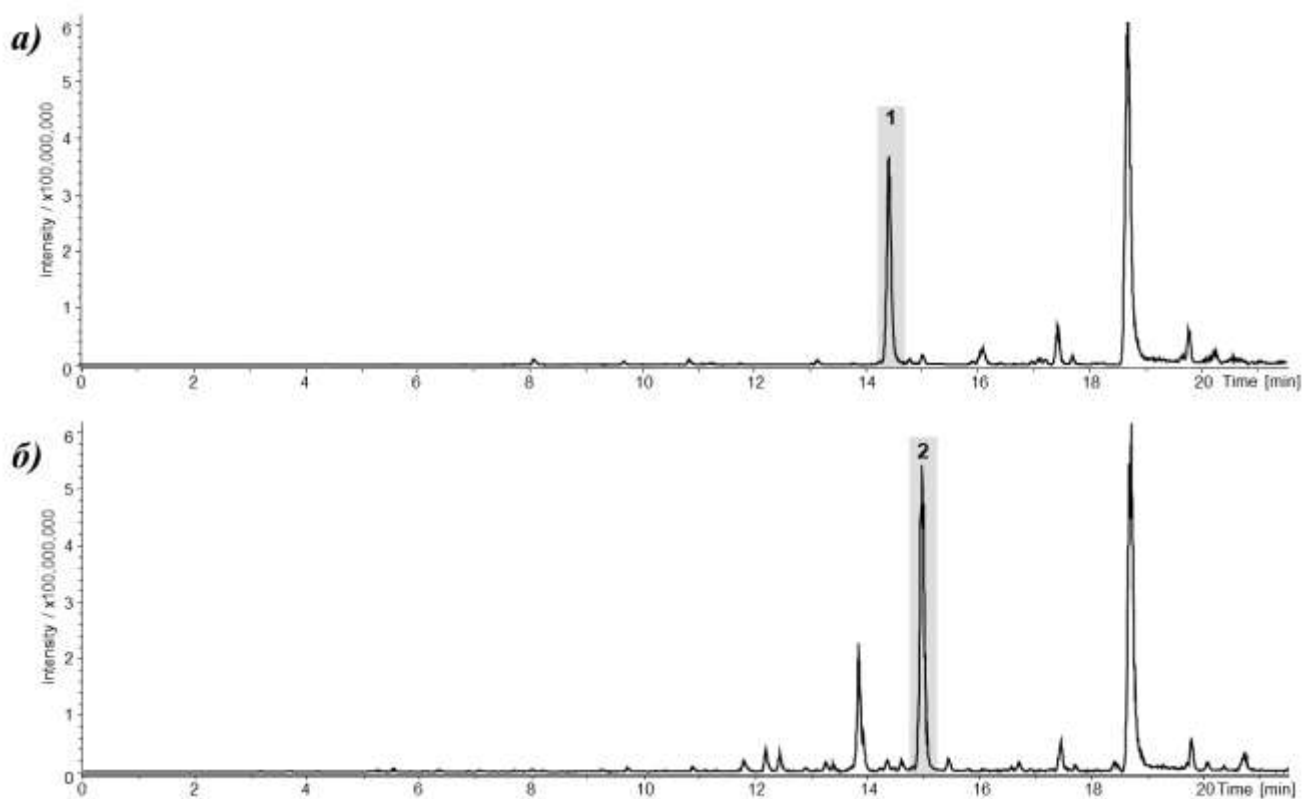


Рис. 3.30. ВЕРХ-МС хроматограма сполук (а) **1** m/z 385,2005 Да $[M+H]^+$ та (б) **2** m/z 443,2187 Да $[M+H]^+$ у фракціях після двох етапів очищення.

Завершальний етап очищення фурахіноцинів здійснювали семі-препаративною ВЕРХ. Додатково, для кожної сполуки розробляли градієнти для розділення, які детально описані в розділі 2.2.16. Сполуку **1** виявляли за довжин хвиль 224, 300 та 408 нм та відбирали між 16 і 17 хв. Відповідно, сполуку **2** виявляли за довжин хвиль 226, 328 та 502 нм та відбирали між 20,2 та 20,8 хв. Якість очищення відібраних фракцій аналізували використовуючи ВЕРХ та випаровували до отримання сухих речовин.

У результаті триетапного очищення етилацетатного екстракту ми отримали 3,2 мг сполуки **1** та 1,4 мг сполуки **2** (рис. 3.31.). У співпраці з кафедрою фармацевтичної біотехнології (проф. Андрій Лужецький) Саарландського

університету (Саарбрюккен, Німеччина) з допомогою ЯМР спектроскопії було розшифровано хімічні структури очищених сполук.

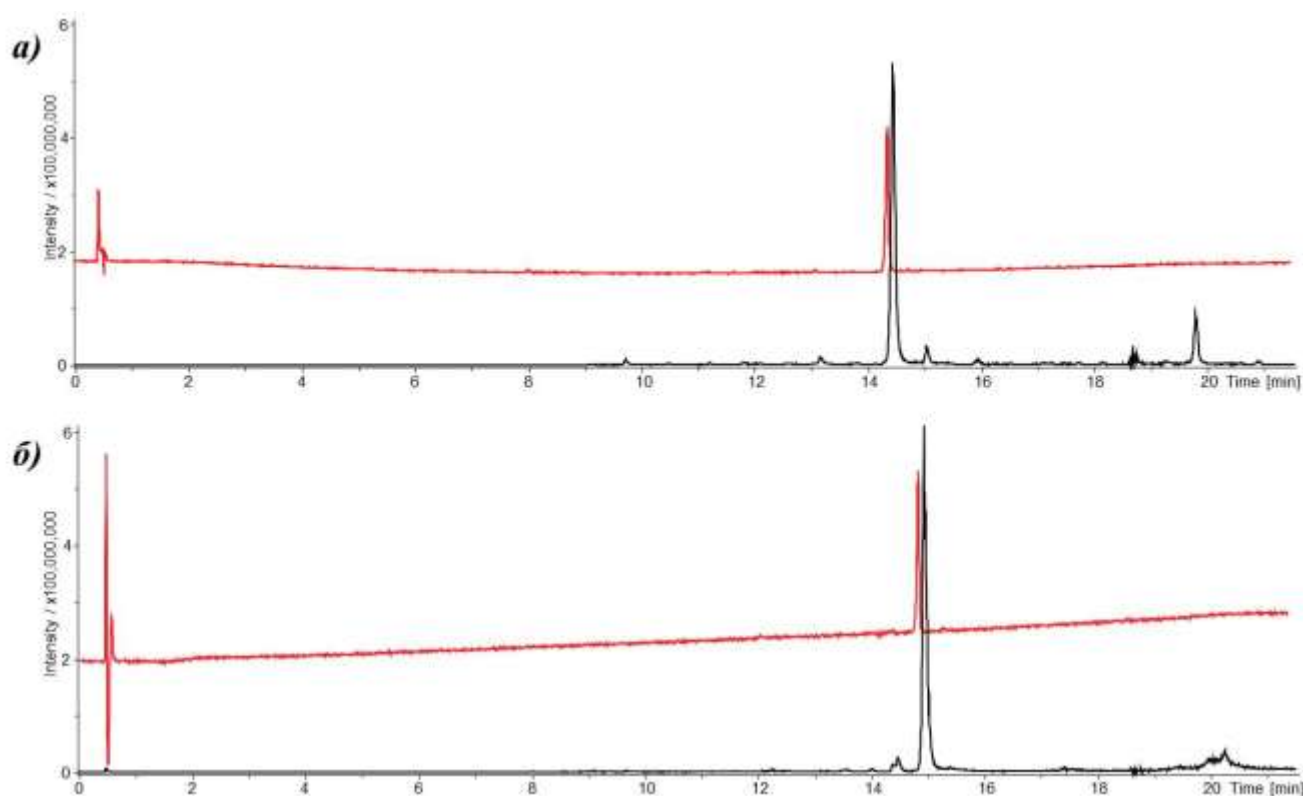


Рис. 3.31. Результати ВЕРХ аналізу очищених сполук: а) піки сполуки **1** з масою m/z 385,2005 Да $[M+H]^+$; б) піки сполуки **2** з масою m/z 443,2187 Да $[M+H]^+$. Чорним кольором показано МС хроматограми, червоним – УФ/ВСС-хроматограми очищених сполук.

На основі моноізотопної маси m/z 384,1926 Да ми встановили молекулярну формулу сполуки **1** – $C_{23}H_{28}O_5$. Її УФ/ВСС-спектр (рис. 3.29.б) свідчить про наявність нафтохінонової частини. В результаті аналізу 1H та ^{13}C ЯМР-спектроскопії разом із множинно редагованою гетероядерною одиночною квантовою кореляцією (англ. multiplicity-edited Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC)) виявили 11 четвертинних атомів вуглецю, два метилени, три метини та сім метильних груп, з яких дві належали до метокси-ланки (δ_C 55,81, δ_H 3,95, 4-OMe та δ_C 60,70, δ_H 4,00, 7-OMe). Ретельний аналіз хімічних зсувів, 2D НН кореляційна спектроскопія (англ. НН Correlated Spectroscopy (НН COSY)) та

гетероядерна кореляція множинних зв'язків (англ. Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC)) (табл. 3.3., рис. 3.32. і Додаток Д, рис. Д1-Д6) дозволили визначити високозаміщений 1,4-нафтохінон та ненасичену монотерпенову одиницю. Структурні особливості досліджуваної сполуки виявили її схожість із відомими фурахіноцинами А-І [87; 105; 154], особливо фурахіноцином С, у структурі якого відсутня метокси-група в С-4 положенні на відміну від сполуки **1**.

Таблиця 3.3.

ЯМР хімічні зсуви та 2D кореляції фурахіноцину К (**1**), записані в дейтерованому хлороформі (CDCl₃)

Позиція	^a δ _C , тип	^b δ _H , mult. (J in Hz)	COSY	^c HMBC
2	87,72, CH	4,84, q (6.6)	16	3, 3a, 9b, 10, 2-Ме, 3-Ме
2-Ме	15,32, CH ₃	1,46, d (6.6)	2	2, 3
3	47,12, C	-	-	-
3-Ме	19,79, CH ₃	1,22, s	-	2, 3, 3a, 10
3a	128,99, C	-	-	-
4	159,77, C	-	-	-
4-ОМе	55,81, CH ₃	3,95, s	-	4, 5
5	103,30, CH	7,21, s	-	3, 3a, 4, 5a, 6,9, 9a
5a	133,58, C	-	-	-
6	180,98, C	-	-	-
7	156,80, C	-	-	-
7-ОМе	60,70, CH ₃	4,00, s	-	7
8	133,31, C	-	-	-
8-Ме	9,26, CH ₃	2,06, s	-	6, 7, 8, 9, 7-ОМе
9	184,10, C	-	-	-
9a	110,20, C	-	-	-
9b	160,23, C	-	-	-
10	37,61, CH ₂	1,93, m	11	2, 3, 3a, 11, 12, 3-Ме
11	23,71, CH ₂	1,59, dd (8.0, 11.9)	10, 12	3, 10, 12, 13
12	123,82, CH	1,94, m	11, 14, 15	10, 11, 14, 15
13	131,90, C	1,77, m	-	-
14	25,65, CH ₃	5,06, m	12, 15	12, 13, 15
15	17,49, CH ₃	-	12, 14	12, 13, 14

Примітка: ^a125 MHz для ¹³C-ЯМР;

^b500 MHz для ¹H-ЯМР;

^cHMBC кореляції від протонів до вказаних вуглеців.

На основі моноізотопної маси сполуки **2** (m/z 442,2108 Да) її молекулярна формула була визначена, як $C_{24}H_{30}N_2O_6$. В 1D та 2D спектрах ЯМР-спектроскопії (табл. 3.4., рис. 3.32. і Додаток Д, рис. Д7-Д12) ми виявили деякі структурні елементи фурахіноцину К (**1**), зокрема групи 8-Ме (δ_C 9,26 і δ_H 2,06) та 7-ОМе (δ_C 60,70 і δ_H 3,99), а також монотерпенову ланку в складі циклічного ефіру. В той же час Н-5 був відсутній, 5-членне ефірне кільце було злито з похідною 1,2-бензохінону (δ_C 179,22 і 139,94), а не з фенолом і карбонілами попереднього 1,4-бензохінону, залишок при С-6 і С-9 були перетворені в залишок гідрохінону (δ_C 147,79 і 149,00). Крім того, молекулярна формула сполуки m/z 443,2187 Да $[M+H]^+$ була збільшена на CH_2N_2O .

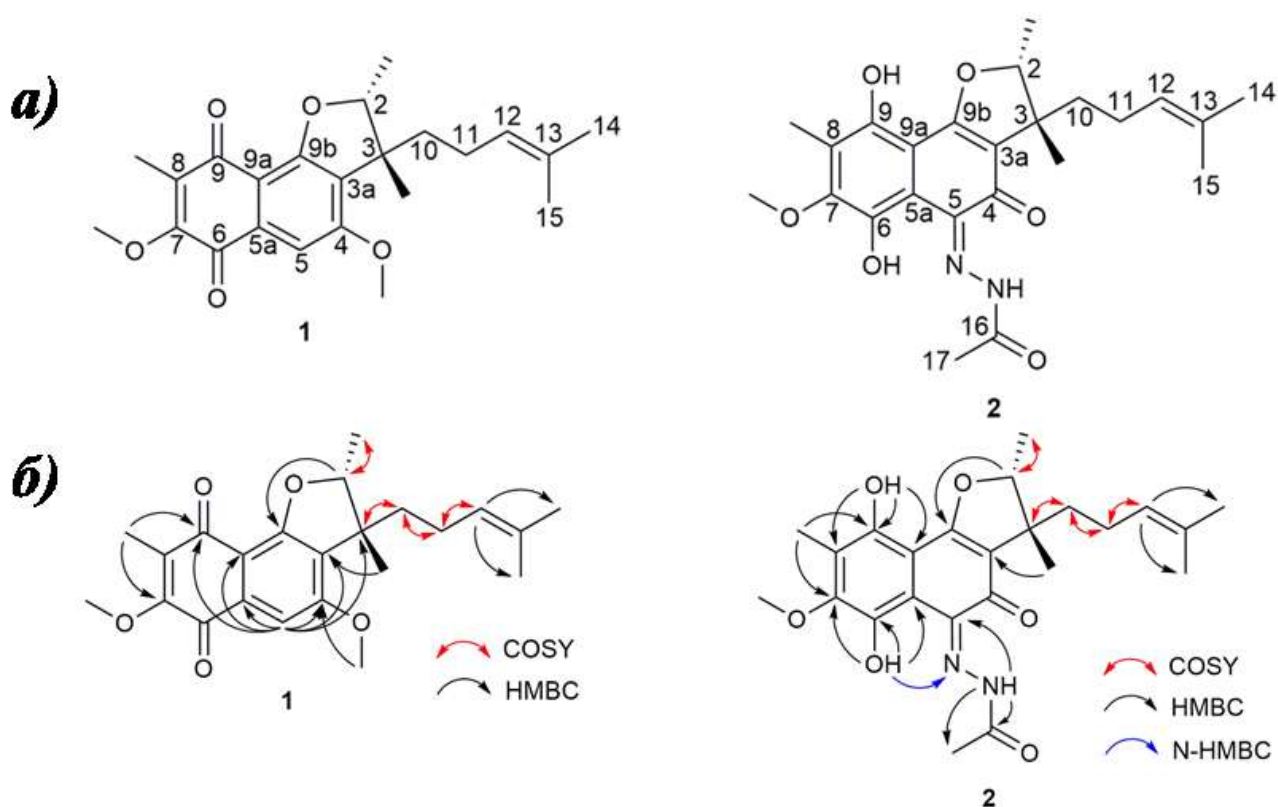


Рис. 3.32. Хімічна структура фурахіноцинів К (**1**) та L (**2**): а) позначені позиції карбонів (див. табл. 3.3 і 3.4); б) COSY та HMBC кореляції.

ЯМР хімічні зсуви та 2D кореляції фурахіноцину L, записані в
дейтерованому хлороформі (CDCl₃)

Позиція	^a δ _C , тип	^b δ _H , mult. (J in Hz)	COSY	^c HMBC
2	91,43, CH	4,99, q (6.5)	2-Ме	3-Ме, 10, 9b
2-Ме	15,83, CH ₃	1,5, d (6.7)	2	2, 3
3	46,41, C	-	-	-
3-Ме	19,21, CH ₃	1,32, s	-	2, 3, 3a, 10
3a	118,74, C	-	-	-
4	179,22, C	-	-	-
5	139,94, C	-	-	-
5-N	^d 301,9, N	-	-	-
5a	109,99, C	-	-	-
6	147,79, C	-	-	-
6-OH	-	12,89, s	-	5a, 6, 7, ^d 5-N
7	153,15, C	-	-	-
7-OMe	60,77, CH	3,99, s	-	7
8	123,08, C	-	-	-
8-Ме	9,10, CH ₃	2,22, s	-	8, 7, 9
9	149,00, C	-	-	-
9-OH	-	8,10, s	-	7, 8, 9, 9a
9a	101,44, C	-	-	-
9b	169,10, C	-	-	-
10	37,91, CH ₂	1,72, m 1,94, m	11	3, 11
11	23,55, CH ₂	1,87, m 2,01, m	10, 12	11, 14, 15
12	123,49, CH	5,09, t (7.37)	11, 14, 15	10, 12
13	132,20, C	-	-	-
14	25,66, CH ₃	1,66, s	12, 15	12, 15
15	17,70, CH ₃	1,56, s	12, 14	12, 14
16	167,03, CO	-	-	-
16-NH	^d 171,7, NH	14,90, s	-	5, 16
17	22,12, CH ₃	2,25, s	-	16, ^d 16-NH

Примітка: ^a125 MHz для ¹³C-ЯМР;

^b500 MHz для ¹H-ЯМР;

^cHMBC кореляції від протонів до вказаних вуглеців.

^dВизначено з експериментів 1H,15N-HSQC та 1H,15N-HMBC у ДМСО, що містить одну краплю трифтороцтова кислота.

Молекулярна формула сполуки **2** містила два атоми нітрогену. Для того, щоб дослідити природу цих атомів ми здійснили $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC та $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMBC (Додаток Д, рис. Д13-Д14). Це дало змогу ідентифікувати сигнал NH при δ_{N} 171,7 і δ_{H} 14,90, а також сигнал N при δ_{N} 301,9, за такої умови дані хімічні зсуви збігаються з одиницею гідразону ($\text{R}^1\text{R}^2\text{C}=\text{NNR}^3\text{R}^4$, де $\text{R}^2, \text{R}^3\text{R}^4$ органічний радикал або атом водню). Також, це було підтверджено кореляцією протона NH з C-5 (δ_{C} 139,94) бензохінону в $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC. Крім того, були виявлені кореляції протона NH і метильної групи (C-17 δ_{C} 22,12, δ_{H} 2,25 s) з атомами вуглецю карбонілу (δ_{C} 179,22, C-16), що вказувало на наявність безпосередньо суміжної ацетильної групи (CH₃CO-). Отже, цей структурний компонент сполуки **2** був визначений, як ацетилгідразон.

Таким чином, ми визначили молекулярні формули та хімічні структури сполук **1** та **2**, яким, враховуючи структурну новизну, присвоїли назви фурахіноцин K та L, відповідно. Фурахіноцин K – перший ідентифікований фурахіноцин із метокси-групою в C-4 положенні, а фурахіноцин L – перший та поки єдиний фурахіноцин з ацетилгідразоновою частиною в структурі.

Фізичні характеристики нових фурахіноцинів:

фурахіноцин K: тверда речовина (порошок) жовтого кольору; 3,2 мг; УФ-спектр (при 73 % ацетонітрилу у $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ HCOOH) λ_{max} (log ϵ) 226 нм (2,31), 264 (1,55), 300 (2,25) і 408 нм (1,04); Дані ЯМР ^1H і ^{13}C (див. Додаток Д); ESI-TOF-MS m/z 385,2005 Да ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (розрахунок для $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{O}_5$ 385,2015 Да).

фурахіноцин L: тверда речовина (порошок) червоного кольору; 1,4 мг; УФ-спектр (76% ацетонітрилу у $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ HCOOH) λ_{max} (log ϵ) 228 нм (2,36), 278 нм (1,74), 328 нм (1,79) і 504 нм (1,59); Дані ЯМР ^1H і ^{13}C (див. Додаток Д); ESI-TOF-MS m/z 443,2187 Да $[\text{M}+\text{H}]^+$ (розрахунок для $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_6$ 443,21821 Да).

3.3.2. Кластер генів та ймовірний шлях біосинтезу нових фурахіноцинів

Структурна новизна фурахіноцинів K та L, очевидно, передбачає відмінність кластеру генів біосинтезу цих сполук від описаного раніше біосинтетичного кластеру фурахіноцину A [99]. Для виявлення кластеру генів біосинтезу

фурахіноцинів K та L секвенували та анотували геном *Streptomyces* sp. Je 1-369. Для цього використовували вільну від РНК сумарну ДНК цього ізоляту в концентрації 382 нг/мкл. Геном секвенували методом Illumina MySeq в режимі швидкого запуску (2×250 н.) з парною відстанню 500 п.н.

Загальний розмір геному ізоляту Je 1-369 становить 8 820 026 п.н. із вмістом Г+Ц 71.0 %, що є типовим для стрептоміцетів [116]. На обох кінцях хромосоми присутні термінальні інвертовані повтори (англ. Terminal Inverted Repeats (TIRs)) розміром 160 307 пн. В результаті анотації геному цього ізоляту ми ідентифікували 7695 ймовірних генів, що кодують білки, 18 генів рРНК, зосереджених в шести оперонах і 87 генів тРНК.

Нуклеотидна послідовність цілого геному *Streptomyces* sp. Je 1-369 задепонована в базі даних генетичної інформації GenBank за номером доступу CP101750.

Ми виявили 36 ймовірних кластерів генів біосинтезу вторинних метаболітів (табл. 3.5.). Серед них було виявлено дев'ять кластерів, що кодують терпени, п'ять – полікетид синтази (ПКС I-III типів) та три – нерибосомальні пептид синтази (НРПС) та кластери, які відповідають за синтез лантипептидів III класу, сидерофорів, ектоїнів, феназинів, бактеріоцинів, бутиролактонів та меланінів, а також кілька гібридних кластерів. Два кластери генів біосинтезу вторинних метаболітів продубльовані на краях хромосоми в TIRs.

Один із кластерів, що розташовані в TIRs, продемонстрував 60% подібності до кластеру генів біосинтезу фурахіноцинів (*fur*). В результаті детального аналізу ідентифікованого кластера в геномі *Streptomyces* sp. Je 1-369 ми виявили суттєву відмінність від описаного *fur* кластеру зі штаму *Streptomyces* sp. KO-3988. Основна відмінність досліджуваних кластерів полягала в кластерній організації генів, тобто в розташуванні генів в кластері. Зокрема, ген пренілтрансферази (*fur7*) в *fur* кластері розташований поряд із генами біосинтезу нафтохінону, а в кластері ізоляту Je 1-369 він знаходиться на краю кластеру (Orf 26). Також, кластер ізоляту Je 1-369 містить значну кількість генів, які не мають ортологів у *fur* кластері. Водночас, усі ключові гени, що беруть участь у формуванні ядра нафтохінону

(відкрита рамка зчитування (англ. Open Reading Frame (Orf) 1-4), поліпренілсинтетази (Orf 22) та пренілтрансферази (Orf 26) були присутні в кластері з ізоляту Je 1-369 (рис. 3.33.).

Таблиця 3.5.

Передбачувані кластери генів та їхні гомологи, що кодують вторинні метаболіти в *Streptomyces* sp. Je 1-369

Кластер	Тип	Найбільш подібний кластер/МІВіГ BGC-ID	Подібність (%)
1	Т2ПКС	Флуостатин/ BGC0001904	74
2	Т3ПКС, феназин, терпен	Фурахіноцин/ BGC0001078	60
3	Т1ПКС	Оксаломіцин Б/ BGC0001106	6
4	RiPP-подібний	-	-
5	Т3ПКС	Віолапірон Б/ BGC0001905	28
6	НРПС, Т1ПКС	Ацилдепсипептид/ BGC0001967	15
7	Ектоін	Нетропсин/ BGC0000327	13
8	НРПС	Мірубактин/ BGC0000392	50
9	Терпен	Ізореніаретин/ BGC0001456	100
10	Ектоін	Ектоін/ BGC0000853	100
11	НРПС, Т1ПКС	Платенцин/ BGC0001156	6
12	Лантипептид III клас	Інформатіпептин/ BGC0000518	42
13	Беталактон	7-деоксипактаміцин/ BGC0000119	5
14	Меланін	Меланін/ BGC0000910	100
15	НРПС, Т1ПКС	Вазабітіде/ BGC0001818	30
16	ПКС-подібний, аміноглікозид, бутиролактон	Кетоніацитон/ BGC0000283	12
17	Терпен	Альбафлавенон/ BGC0000660	100
18	Т1ПКС	Стамбоміцин А/ BGC0000151	20
19	Терпен	Рібостаміцин/ BGC0000713	7
20	Сидерофор	-	-
21	НРПС	Коеліхелін/ BGC0000325	100
22	Терпен	2-метилізоборнеол/BGC0000657	75
23	RiPP-подібний	-	-
24	Терпен	Геосмін/ BGC0001181	100
25	НРПС, НРПС-подібний	Кадазид/ BGC0001968	23
26	Т3ПКС, феназин	Ендофеназин/ BGC0001080	77
27	Терпен	Канаміцин/ BGC0000703	6
28	Терпен	Хопен/ BGC0000663	84
29	Т1ПКС	Монензин/ BGC0001670	100
30	Інший	А-503083 А/ BGC0000288	7
31	RiPP-подібний	-	-
32	НРПС, Т3ПКС	Фегліміцин/ BGC0001233	78
33	Терпен	Мерохлорин/ BGC0001083	7
34	Т1ПКС, hglE-КС, терпен	Рифаморфолін/ BGC0001759	9
35	Т3ПКС, феназин, терпен	Фурахіноцин/ BGC0001078	60
36	Т2ПКС	Флуостатин/ BGC0001904	74

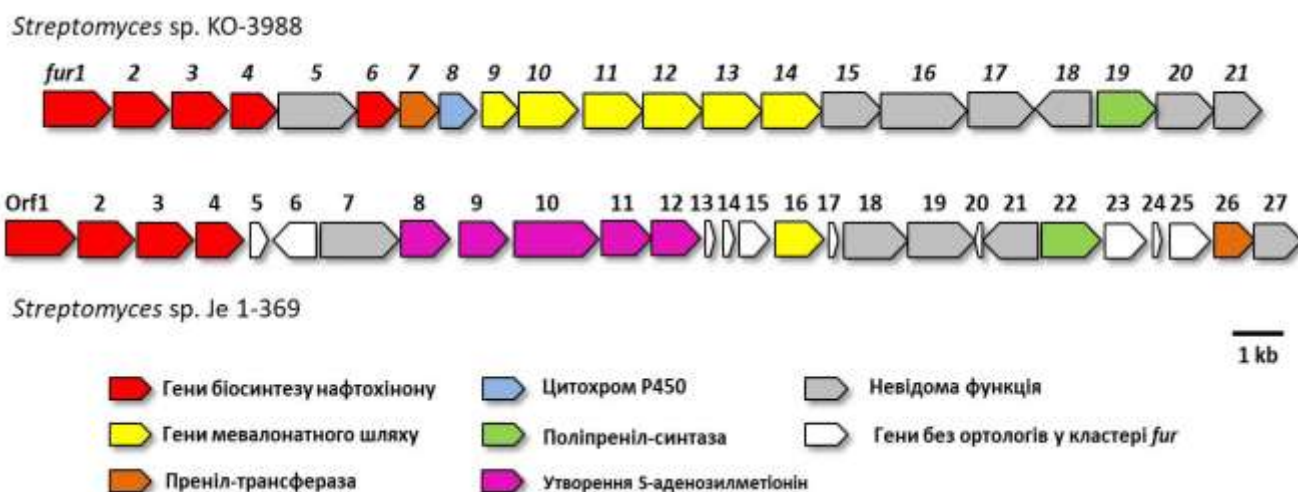


Рис. 3.33. Порівняння кластерів генів біосинтезу фурахіноцину зі штаму *Streptomyces* sp. KO-3988 (вгорі) та ізоляту *Streptomyces* sp. Je 1-369 (внизу).

Варто також зазначити, що на відмінну від *fur* кластеру, п'ять із шести генів мевалонатного шляху в кластері ізоляту Je 1-369 були відсутні, але ці гени були виявлені за межами кластеру. Водночас, повний набір генів (Orf 8 – Orf 12) необхідний для перетворення S-аденозилгомоцистеїну в S-аденозилметіонін (SAM) міститься в кластері ізоляту Je 1-369 (рис. 3.33 і табл. 3.6). Ці дані вказують на участь виявленого кластеру у синтезі фурахіноцинів K та L.

Таблиця 3.6.

Ідентифіковані ORFs, їхні передбачувані функції та відповідні гомологи в кластері генів біосинтезу фурахіноцину (*fur*)

Гени в Je 1-369	ORFs з кластеру <i>fur</i>		Предбачуваний продукт (% подібності) та їхній ID*
	ген	% подібність/перекриття	
1	2	3	4
Orf 1	<i>fur1</i>	81/99	ПКС III типу <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (98,0%), A0A6B2SFW1
Orf 2	<i>fur2</i>	81/88	Купін доменвмісний білок <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (93,8%), A0A6B2SAS0
Orf 3	<i>fur3</i>	81/93	амінотрансфераза <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (93,8%), WP 150181863
Orf 4	<i>fur4</i>	74/88	SAM-залежна метилтрансфераза <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (86,8%), A0A6B2SP85
Orf 5			NAD(P)H:хінон оксидоредуктаза <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (96,0%), A0A6B2SAG1

1	2	3	4
Orf 6			еноіл-КоА гідратаза/ізомераза <i>Frankia</i> sp. EUN1f (32,5%), D3CRF9
Orf 7	<i>fur5</i>	73/98	ацил-КоА лігаза <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (95,3%), A0A6B2SZ49
Orf 8			S-аденозилметіонін синтаза <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (97,5%), A0A6B2SM86
Orf 9			карбогідрат кіназа <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (92,0%), A0A6B2SJJ8
Orf 10			метіонін синтаза <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (92,5%), A0A6B2SFQ1
Orf 11			метилентетрагідрофолат редуктаза <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (93,4%), A0A6B2ST43
Orf 12			аденозилгомоцистеїназа <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (94,9%), A0A6B2SGN4
Orf 13			поверхневий білок <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (68%), A0A6B2SEN8
Orf 14			TetRC 16 доменвмісний білок <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (92,3%), A0A6B2SJP1
Orf 15			MFS транспортер <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (96,1%), A0A6B2SIA2
Orf 16	<i>fur9</i>	68/93	мевалонат кіназа <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (75,0%), A0A6B2SSL0
Orf 17			ймовірний білок <i>Streptomyces</i> sp. SID10115(52,2%), A0A6B2SMM5
Orf 18	<i>fur16</i>	72/92	FAD-зв'язуючий білок <i>Streptomyces</i> sp. Ru71 (72,2%), A0A2S4YSV4
Orf 19	<i>fur17</i>	75/92	3-карбоксі-cis,cis-муконат циклоізомераза <i>Streptomyces</i> sp. Ru71 (77,8%), A0A2S4YT60
Orf 20			петля-поворот-петля доменвмісний білок <i>Streptomyces</i> sp. SID10116 (100%), A0A6B2SPW8
Orf 21	<i>fur18</i>	54/99	неохарактеризований білок <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (94,7%) A0A6B2ST33
Orf 22	<i>fur19</i>	71/98	поліпреніл синтаза <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (95,5%), A0A6B2SPK4
Orf 23			FAD-зв'язуючий білок зі <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (90,5%), A0A6B2STJ0
Orf 24			Піридин нуклеотид-дисульфід оксидоредуктаза <i>Streptomyces</i> sp. MZ04 (45,5%), A0A4R9EYD3
Orf 25			цитохром bc1 комплекс <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (94,3%), A0A6B2SYI1
Orf 26	<i>fur7</i>	66/98	пренілтрансфераза зі <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (92,7%), A0A6B2SAL2
Orf 27	<i>fur21</i>	61/99	метилтрансфераза доменвмісний білок <i>Streptomyces</i> sp. SID10115 (96,8%), A0A6B2SFQ2

Примітка: * Найкращий збіг, знайдений UniProt Protein-Protein BLAST.

Враховуючи доступні дані про біосинтез фурахіноцинів та подібних меротерпеноїдів, ми сформуваємо ймовірну схему біосинтезу фурахіноцинів K та L (рис. 3.34.). На початковому етапі біосинтезу фурахіноцинів, ацетат за дії ацил-КоА лігази (Orf 7) перетворюється в ацетил-КоА. Утворений ацетил-КоА далі використовується для утворення терпенових попередників диметилалілпірофосфату (ДМАПФ) та ізопентилпірофосфату (ІПФ). У синтезі ДМАПФ та ІПФ задіяні гени мевалонатного шляху, які у *Streptomyces* sp. Je 1-369

розташовані в іншому локусі геному поза кластером біосинтезу фурахіноцинів. Orf 22, яка анотована як поліпреніл синтаза, з'єднує ДМАПФ та ПФ, утворюючи геранілдифосфат (ГДФ), який на пізнішій стадії біосинтезу утворює ізопреновий хвіст фурахіноцинів.

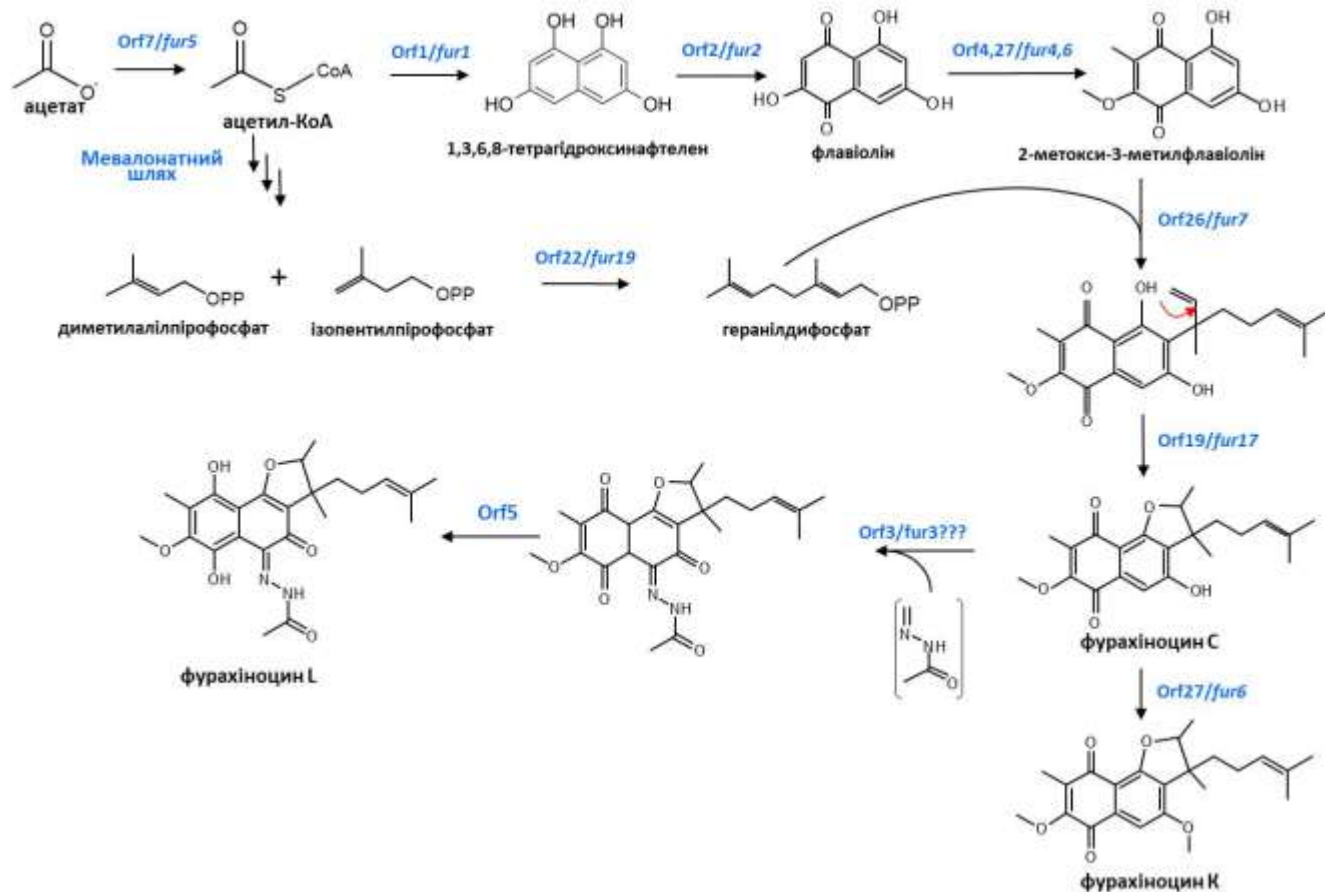


Рис. 3.34. Передбачуваний шлях біосинтезу фурахіноцинів К та L.

Крім того, ацетил-КоА використовується і в реакції карбоксилювання, перетворюючись в малоніл-КоА. П'ять молекул малоніл-КоА конденсуються та ароматизуються з утворенням 1,3,6,8-тетрагідроксинафтелену (ТГН). Реакцію утворення ТГН контролює полікетидсинтаза III типу (Orf 1), яка має просту гомодимерну структуру. На наступному етапі біосинтезу, монооксигеназа (Orf 2) окислює ТГН, нафталінову кільцеву систему наполовину, утворюючи флавіолін, який потім С- і О-метилується метилтрансферазами (Orf 4 та Orf 27) з утворенням 2-метокси-3-метилавіоліну.

Утворений на першому етапі біосинтезу ГДФ приєднується до 2-метокси-3-метилавіоліну. Цю реакцію забезпечує продукт гена Orf 26, який імовірно, каталізує зворотне пренілювання, що приєднує C-3 ізопреноїдного попередника до нафталінового ядра. Подальша циклізація бічного ланцюга ізопреноїду з гідроксильною групою флавіоліну включає з'єднання між киснем фенолу та карбоном з подвійним зв'язком, що приводить до утворення п'ятичленого циклічного ефіру, утворюючи фурахіноцин С. При формуванні структури фурахіноцину К, у фурахіноцині С додатково О-метилується вільний гідроксил.

Кінцевий етап біосинтезу фурахіноцину L відрізняється від фурахіноцину К, оскільки фурахіноцин L містить у своїй структурі ацетилгідрозон. Ймовірно, приєднання ацетилгідрозону відбувається перед метилуванням нафталінового ядра фурахіноцину С, оскільки приєднання ацетилгідрозону порушує валентність атома карбону, яка компенсується розірванням подвійного зв'язку. Інший атом карбону компенсує розірвання подвійного зв'язку шляхом переміщення атому водню з гідроксильної групи, утворюючи таким чином карбонільну групу в цьому положенні. Ймовірно, у каскаді реакцій утворення та приєднання ацетилгідрозону бере участь ген амінотрансферази (Orf 3). Крім того, ми детально дослідили знайдений кластер, на наявність генів, залучених до утворення зв'язку N–N. Однак, як видно з Таблиці 3.6. в ідентифікованому кластері ми не знайшли жодного гена, функція якого б передбачала його залучення до утворення зв'язку N–N. Тому, ймовірно, позакластерні гени або гени, функція яких ще не охарактеризована, можуть брати участь у формуванні зв'язку N–N у структурі фурахіноцину L.

Останньою реакцією у біосинтезі фурахіноцину L є відновлення карбонільних груп флавіоліну до гідроксильних груп, яку контролює NAD(P)H:хінон оксидоредуктаза (Orf 5).

3.3.3. Біологічна активність нових фурахіноцинів

Для меротерпеноїдів характерний широкий спектр біологічних активностей. Зокрема, для фурахіноцинів описана здебільшого цитотоксична дія [87; 154].

Виявлені в цьому дослідженні нові фурахіноцини значно відмінні за своєю хімічною структурою від описаних. Ці відмінності можуть мати вплив на їхню біологічну активність.

Ми дослідили антимікробну активність, фурахіноцинів К і L проти широкого спектру тест-штамів бактерій, дріжджів і грибів, включно з *B. subtilis* DSM 10, *S. aureus* Newman, *M. smegmatis* mc2155, *E. coli* BW25113 (wt), *E. coli* JW0451-2 (Δ acrB), *P. aeruginosa* PA14, *A. baumannii* DSM 30008, *C. freundii* DSM 30039, *C. albicans* DSM 1665, *C. neoformans* DSM 11959, *P. anomala* DSM 6766 та *M. hiemalis* DSM 2656 (табл. 3.7.). Крім того, для визначення можливої цитотоксичності отримані сполуки тестували на клітинній лінії HepG2.

Фурахіноцин К не виявляв антимікробної активності проти використаних тест-культур, але продемонстрував цитотоксичність проти лінії клітин HepG2 зі значенням IC₅₀ 12,6 мкг/мл, подібно до описаних фурахіноцинів та їхніх аналогів [87]. Це можна пояснити невеликою різницею в хімічних структурах фурахіноцинів С і К, яка полягає в метоксигрупі в положенні С-4.

Таблиця 3.7.

Антибіотична активність нових фурахіноцинів

Тест-культури	Фурахіноцин К (MIC, мкг/мл)	Фурахіноцин L (MIC, мкг/мл)
<i>Bacillus subtilis</i> DSM-10	>64	64
<i>Staphylococcus aureus</i> Newman	>64	2
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc2155	>64	>64
<i>Escherichia coli</i> BW25113 (wt)	>64	>64
<i>E. coli</i> JW0451-2 (Δ acrB)	>64	>64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	>64	>64
<i>Acinetobacter baumannii</i> DSM-30008	>64	>64
<i>Citrobacter freundii</i> DSM-30039	>64	>64
<i>Candida albicans</i> DSM-1665	>64	>64
<i>Cryptococcus neoformans</i> DSM-11959	>64	>64
<i>Pichia anomala</i> DSM-6766	>64	>64
<i>Mucor hiemalis</i> DSM-2656	>64	>64
HepG2	12,6 ± 1.0	>37

Водночас, ми припустили, що ацетилгідразон в структурі фурахіноцину L, може, мати значний вплив на активність, оскільки N–N-вмісні природні сполуки

виявляють різноманітний спектр біологічної активності [23]. Фурахіноцин L виявляв антагоністичну активність лише проти грампозитивних бактерій *B. subtilis* DSM 10 (значення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) 64 мкг/мл) та штаму *S. aureus* Newman (МІК 2 мкг/мл). Крім того, фурахіноцин L не виявляв цитотоксичного ефекту проти лінії клітин HepG2 за максимальних значень концентрації (37 мкг/мл). Таким чином, наскільки нам відомо, це перший фурахіноцин із антибактеріальною активністю.

Підсумки до розділу

З екстракту вторинних метаболітів ізоляту *Streptomyces* sp. Je 1-369 виділено два нові меротерпеноїди фурахіноцини K та L, які мають в своїй структурі нафтохінон. Їхні структури були з'ясовані за допомогою ЯМР-спектроскопії і виявлено, що вони містять модифікації полікетид-нафтохінонового скелету, які донині не були описані для фурахіноцинів. Крім того, в структурі фурахіноцину L присутній доволі рідкісний для природних сполук фрагмент ацетилгідрозону.

Ідентифіковано кластер генів біосинтезу фурахіноцинів в ізоляті Je 1-369, який продемонстрував схожість (60%) з *fur* кластером зі штаму *Streptomyces* sp. KO-3988. Запропоновано ймовірний шлях біосинтезу фурахіноцинів K та L на основі наявних даних біосинтезу фурахіноцину C та подібних сполук.

Виявлено цитотоксичну активність фурахіноцин K, щодо клітинної лінії HepG2 на рівні 12,6 мкг/мл (IC₅₀). Водночас, для фурахіноцину L характерна антибактеріальна активність проти грам-позитивних бактерій *S. aureus* Newman МІС на рівні 2 мкг/мл та *B. subtilis* МІС на рівні 64 мкг/мл, але не виявлено цитотоксичної активності.

Матеріалами цього розділу опубліковано в статті [220] та тезах конференцій [254].

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Природні сполуки мікробного походження відіграють ключову роль у розробленні ліків, особливо коли мова йде про боротьбу з інфекціями [149]. 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 [9]. Розроблення нових лікарських препаратів в багатьох випадках ґрунтується на застосуванні природних біологічно активних сполук, виділених з мікроорганізмів [2; 136]. 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 [51].

Однією зі стратегій відкриття нових природних біологічно активних сполук, включно з антибіотиками, є дослідження мікроорганізмів, виділених у ще незвіданих середовищах існування [81]. Значний інтерес також викликає скринінг рідкісних родів актиноміцетів [207]. Одним з мало вивчених середовищ існування мікроорганізмів є Кримський півострів. До початку наших досліджень інформації про різноманіття мікробіому цього біотопу було обмаль [245]. В результаті метаболічного профілювання окремих ізолятів актиноміцетів, раніше виділених з цього регіону, виявлено нові природні сполуки з широким спектром антибіотичної дії [166-171]. Однак, для з'ясування перспективності досліджень мікробіоти Кримського півострова як джерела природних сполук, в т.ч. нових, необхідний більш комплексний підхід, який включатиме філогенію усіх ізолятів окремих біотопів цього регіону, вивчення їхніх біологічних властивостей та визначення хімічної будови природних сполук, які зумовлюють ці властивості. Наше дослідження зосереджене на вивченні актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*, оскільки ризосферна мікробіота зазвичай є більш різноманітною. Хоча флора Кримського півострова представлена багатством ендемічних видів, ми

зацікавилися уразливим видом ялівцю, який в межах України розповсюджений лише на території ПБК. Ця рослина продукує велику кількість ефірних олій з різноманітними лікарськими властивостями. Відомо, що мікроорганізми асоційовані з лікарськими рослинами є дуже продуктивним джерелом біологічно активних речовин медичного спрямування [152].

У роботі досліджено 372 ізоляти актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*, які були виділені шляхом комбінації різних методів з наступним висіванням на різні поживні середовища. В результаті філогенетичної характеристики актиноміцетних ізолятів виявили, що вони представлені сімома родинами та одинадцятьма родами класу *Actinomycetia*. Домінуючим серед цих ізолятів був рід *Streptomyces*. Як відомо, стрептоміцети значно поширені в наземних екосистемах, де разом з іншими мікроорганізмами відіграють важливу екологічну роль як ґрунтоутворюючі бактерії [70]. Виявлено 22 ізоляти нестрептоміцетів, серед яких були представники деяких досить рідкісних родів. Зокрема, три ізоляти (Je 1-106, Je 1-148 і Je 1-339) роду *Promicromonospora* (на сьогодні ідентифіковано 19 видів [265]) та ізолят Je 1-571 роду *Actinorectispora*. Цей нещодавно відкритий рід актиноміцетів наразі включає лише два типові штами, а саме *A. indica* [165] та *A. metalli* [33]. На сьогодні немає жодних даних про спектр вторинних метаболітів, які можуть продукувати представники цього роду. Ідентифіковано також роди *Amycolatopsis* і *Saccharopolyspora* з родини *Pseudonocardiaceae*, представники яких є промисловими продуцентами клінічно важливих антибіотиків. Зокрема, рифампіцин і ванкоміцин, які продукують актиноміцети роду *Amycolatopsis* [201] та еритроміцин і спінозин, які є продуктами синтезу актиноміцетів роду *Saccharopolyspora* [186]. Виявлення рідкісних родів актиноміцетів в ризосфері *J. excelsa*, зокрема *Actinorectispora*, *Promicromonospora*, *Amycolatopsis* та *Saccharopolyspora*, вказує на значне філогенетичне розмаїття кримської мікробіоти, що може передбачати багатий склад природних біологічно активних сполук, серед яких є висока ймовірність відкриття нових.

Одним з ефективних підходів оцінки здатності продукувати антибіотичні сполуки у великій кількості актиноміцетних культур є вивчення їхніх

антагоністичних властивостей проти різних груп мікроорганізмів [14]. Це дає змогу оцінити біосинтетичний потенціал ізолятів, як продуцентів різних за механізмом дії антимікробних сполук. Ми виявили, що ізоляти суттєво відрізнялися між собою за спектром та рівнем антимікробної активності. Серед них, були антагоністи, які специфічно інгібували грампозитивні (*Streptomyces* sp. Je 1-101, *Streptomyces* sp. Je 1-253 та інші), грамнегативні бактерії (*Streptomyces* sp. Je 1-208, *Streptomyces* sp. Je 1-392 та інші), дріжджі (*Streptomyces* sp. Je 1-22.2) чи лише цвілеві гриби (*Streptomyces* sp. Je 1-386 та *Streptomyces* sp. Je 1-590). У той же час деякі ізоляти інгібували більшість використаних тест-культур (*Streptomyces* sp. Je 1-620, *Streptomyces* sp. Je 1-651 та інші) (Додаток Б, Таблиця Б1). Це вказує на значний потенціал ізолятів до продукування антибіотичних сполук як широкого спектру дії, так і специфічних проти певних збудників, що є передумовою для глибшого дослідження окремих ізолятів.

Досліджувані природні ізоляти актиноміцетів виявляли фітостимулювальні властивості. В їхній основі лежить здатність актиноміцетів виконувати різноманітні корисні функції у ґрунті, які сприяють поліпшенню родючості і продуктивності рослин [21]. Зокрема, ми виявили ізоляти актиноміцетів із здатністю фіксувати атмосферний азот, солюбілізувати нерозчинні форми Фосфору, синтезувати ІОК та сидерофори. Окремі ізоляти поєднували декілька фітостимулювальних властивостей, таких як синтез сидерофорів, солюбілізація Фосфору та синтез ІОК (*Streptomyces* spp. Je 1-149, Je 1-221, Je 1-246, Je 1-332 та інші). Крім того, ці ізоляти демонстрували й антибіотичну активність проти фітопатогенних мікроорганізмів. Такий широкий спектр біологічних активностей ґрунтових актиноміцетів може бути зумовлений високим рівнем конкурентності за джерела живлення з іншими групами тамтешньої мікробіоти. Це може бути наслідком низького вмісту органіки в ґрунті, посушливістю досліджуваного регіону тощо. Однак, це сприяє нашому інтересу до цих ізолятів актиноміцетів, які можуть бути як джерелом потенційно нових біологічно активних сполук, так і платформою для розробки препаратів біоконтролю інфекційних захворювань рослин [27].

Відповідно до отриманих результатів антибіотичної активності, ми відібрали декілька актиноміцетних ізолятів для хімічного аналізу їхніх вторинних метаболітів. Використовуючи дереплікативний аналіз екстрактів, ми виявили продуцентів таких антибіотиків, як десертomicин А, канханаміцин А, стрепторубін В, спектинабілін (*Streptomyces* sp. Je 1-42); антиміцини (*Streptomyces* sp. Je 1-93); спіраміцини та стамбоміцини (*Streptomyces* sp. Je 1-651). Варто виокремити антибіотики антиміцини та спіраміцини. Антиміцини, яких сьогодні відомо більше 40, виявляють сильну токсичну активність та використовуються в США, як пестицид в рибному господарстві. Механізм дії антиміцинів полягає у пригніченні активності цитохром-с-редуктази в ланцюзі транспортування електронів і зупинці дихання [189]. Також, антиміцини розглядають, як потенційні протипухлинні препарати, зокрема в комбінації з іншими хіміотерапевтичними засобами. Це обумовлено їхньою інгібіторною активністю щодо мітохондріальних антиапоптозних білків Bcl-2 і Bcl-xL, які надмірно виробляють ракові клітини, стійкі до хіміотерапевтичних препаратів [226]. Макролідний антибіотик спіраміцин використовують як антимікробний та протипаразитарний засіб. Він має широкий спектр дії проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, таких як *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Neisseria* spp., *Chlamydia* spp. і *Legionella* spp.. Спіраміцин ефективний у лікуванні інфекцій верхніх та нижніх дихальних шляхів, шкіри, м'яких тканин, статевих органів та інших органів і систем організму [111]. Зважаючи на те, що спіраміцин широко використовується в лікувальній практиці, ізолят *Streptomyces* sp. Je 1-651 має певну перспективу в подальших дослідженнях, особливо щодо рівня продукції.

Скринінг природних сполук, який ґрунтується на антагоністичних властивостях актиноміцетів, є рутинним і практично “сліпим”. Оскільки пригнічення росту тої чи іншої групи мікроорганізмів може дати змогу спрогнозувати лише потенційний клас сполук, які забезпечують антимікробну дію. Розробка біосенсорів відкрила можливості проводити більш направлений скринінг перспективних класів природних сполук. Ці системи скринінгу засновані

на клітинах, які несуть репортерні гени, наприклад β -галактозидази, β -глюкоронідази або люциферази й злиті з промоторами, які специфічно реагують на присутність певного класу антибіотиків [64]. Використовуючи три різні біосенсорні системи, ми протестували виділені актиноміцети на здатність до продукування тіопептидних антибіотиків, антибіотиків активних проти формування клітинної стінки та антибіотиків з групи памаміцинів.

Низка ізолятів індукували ріст використаних штамів-біосенсорів. В результаті дереплікативного аналізу ми визначили сполуки-індуктори. Зокрема, ідентифікували продуцентів тіопептидних антибіотиків бернінаміцину А і В, а також продуцентів лідикаміцинів та памаміцинів. Крім того, у цьому дослідженні ми вперше використали специфічний біосенсор *S. lividans* TK24 pMO16 для виявлення тіопептидних антибіотиків серед природних ізолятів актиноміцетів та довели його ефективність [217].

Використовуючи специфічний біосенсор для виявлення тіопептидних антибіотиків, виявили лише два ізоляти. Це не дивно, оскільки використаний біосенсор націлений лише на виявлення тіопептидних антибіотиків. Крім того, ці антибіотики є структурно складними природними сполуками, які не мають значного поширення в природному середовищі [231]. В той же час, у досліджуваному біотопі ми виявили значно більше потенційних продуцентів інгібіторів клітинної стінки та антибіотиків з групи памаміцинів - 31 та 26, відповідно. Це може вказувати на значне розповсюдження таких сполук у досліджуваному середовищі існування актиноміцетів. До того ж, біосенсор на основі двокомпонентної системи LiaRS має меншу специфічність щодо певного класу сполук. Наприклад, на формування клітинної стінки бактерій впливають значна кількість різних класів антибіотиків, таких як глікопептиди, бета-лактамі антибіотики та інші [184]. У свою чергу, значне поширення памаміцинів можливо продиктоване їхніми властивостями, оскільки крім антибіотичної активності для них характерна й ріст-регулювальна. Наприклад, у актиноміцетів вони індукують перехід від субстратного до повітряного міцелію, що може мати позитивний вплив на розповсюдження актиноміцетів в середовищі [76]. Таким чином,

виявлені в ході скринінгу ізоляти доповнюють колекцію продуцентів антибіотиків та можуть бути перспективними для подальших досліджень.

Обидва використаних підходи дали змогу з'ясувати, що на території Кримського півострова, зокрема в ризосфері *J. excelsa*, розповсюджені продуценти антибіотиків з широким спектром біологічної дії від антибактерійної чи антифунгальної до цитотоксичної. Однак, нові природні сполуки можна виявити лише шляхом рутинного скринінгу. Як ми згадували раніше, за тривалі роки скринінгових програм сьогодні виявити нову природну сполуку досить складно. Однак, мікробіота Кримського півострова, як і ризосферна *J. excelsa*, дуже мало досліджена [166-171; 217-221; 245; 248; 259-261]. В ході рутинного скринінгу та хімічного аналізу вторинних метаболітів ми виявили *Streptomyces* sp. Je 1-369 з широким спектром антимікробної дії, на ВЕРХ-МС хроматограмі екстрактів якого детектували кілька піків. В результаті комплексу експериментів, від дереплікації до ЯМР, ми виявили дві нові природні сполуки меротерпеноїдної природи, в основі яких є нафтохінон. За подібністю цих структур до фурахіноцинів ми присвоїли їм назви фурахіноцин К та фурахіноцин L [105].

Фурахіноцини — це невелика родина меротерпеноїдів, до якої входять фурахіноцини А–J [87; 105; 154], фуранонафтохінон I, який є регіоізомером фурахіноцину С [188], а також похідні фурахіноцинів PI-220 [94] і JBIR-136 [98]. Фурахіноцини А–J та їхні гомологи відрізняються між собою лише модифікацією бічних терпенових ланцюгів. Проте, виділені в нашій роботі фурахіноцини К і L мають модифікацію нафтохінонової частини, що робить їх структурно відмінними фурахіноцинами. Ба більше, до складу фурахіноцину L входить ацетилгідразоновий фрагмент, який досить рідко зустрічається поміж природних сполук [23]. Через те, сьогодні, відносно мало відомо про біосинтез та формування в природних сполуках гідразону. Нещодавнє дослідження довело, що гідразонова група утворюється неферментативним з'єднанням Джаппа–Клінгеманна між електрофільним діазотованим алкіл-5-гідроксилантранілатом і попередником циклічного пептиду, що містить β -кетоальдегід, під час біосинтезу тазикаміду [128]. Враховуючи кардинальну різницю будови між тазикамідами та

фурахіноцином L, утворення гідразонової групи у цих сполук може відбуватися за різними механізмами.

Структурна відмінність ідентифікованих фурахіноцинів, наштовхнула нас на пошук та дослідження кластеру генів біосинтезу фурахіноцинів у *Streptomyces* sp. Je 1-369. Кластер генів біосинтезу фурахіоцину В був раніше ідентифікований у ході дослідження Kawasaki та інші, де було доведено, що він містить увесь набір генів мевалонатного шляху, які беруть участь у формуванні попередників ізопреноїдів [99]. Більшість штамів *Streptomyces* spp. містять лише метил-D-еритритолфосфатний (анг. methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway), відомий також, як немевалонатний шлях для утворення попередників ізопреноїдів [45]. Однак, поряд із MEP шляхом деякі штами стрептоміцетів містять мевалонатний шлях, який в основному використовується для синтезу ізопреноїдних антибіотиків [89; 191].

В результаті аналізу геному ізоляту *Streptomyces* sp. Je 1-369 ми виявили кластер генів, який на 60% гомологічний з кластером генів біосинтезу *fur* та розташований в TIR на кінцях хромосоми. Наявність кластерів генів, які дублюються в хромосомах стрептоміцетів, називають “супер кластерами” і часто це може впливати на підвищений рівень продукції [215]. Цілком імовірно, що за рахунок присутності двох копій біосинтетичного кластеру нам вдалося виявити піки нових фурахіноцинів. Адже природний рівень синтезу вторинних метаболітів у більшості актиноміцетів є зазвичай дуже низький, що часто унеможливорює детекцію нових сполук.

В ідентифікованому кластері були присутні усі ключові гени, які задіяні у біосинтезі фурахіноцинів. Зокрема гени, які беруть участь у формуванні ядра нафтохінону та ізопреноїдної частини (поліпренілсинтетаза та пренілтрансфераза). Проте, незважаючи на високу гомологію між кластерами біосинтезу фурахіноцинів, їхня організація значно відрізнялася. Зокрема, ми виявили, що в кластері генів ізоляту *Streptomyces* sp. Je 1-369 відсутній повний набір генів мевалонатного шляху, але наявний сет генів перетворення S-аденозилгомоцистеїну в S-аденозилметіонін. Подібне розташування генів має

місце в кластері генів біосинтезу фуранонафтохінону I, який є регіоізомером фурахіноцину C [74]. Оскільки біосинтез фурахіноцинів та фуранонафтохінону I, як і багатьох інших вторинних метаболітів, включає SAM-залежні реакції метилювання, метаболічна перевага включення цих генів у кластери очевидна.

Біосинтез нафтохінон вмісних меротерпеноїдів здійснюється через утворення ТГН. У бактерій ТГН утворюється шляхом конденсації та ароматизації п'яти субодиниць малоніл-коА під контролем ТГН-синтази, яка має просту гомодимерну структуру полікетид-синтази III типу [11]. Далі відбувається пренілювання, де в якості донорів можуть бути преніл, гераніл чи фарнезилпірофосфат, які приєднуються до нуклеофільних положень C-2 і C-4 ТГН через електрофільні ароматичні реакції заміщення, що каталізуються ферментами ароматичної пренілтрансферази [78]. Згодом, пренільовані сполуки зазнають низки реакцій модифікації (окислення, галогенування чи циклізації) до фінальних структур. За таким механізмом біосинтезу утворюються меротерпеноїди мерохлорини [100], маринони [157] і напірадіоміцин [195]. На відміну від інших меротерпеноїдів, де пренілюванню ТГН передують подальші реакції окислення, деароматизації або галогенування, в біосинтезі фурахіноцинів монооксигеназа Fur2 окислює половину нафтеленового кільця, утворюючи флавіолін, який потім метилюється з утворенням 2-метокси-3-метилфлавіоліну. Крім того, *in vitro* було доведено, що 2-метокси-3-метилфлавіолін є кращим субстратом для приєднання ГДФ для пренілтрансферази Fur7, ніж флавіолін [109]. Подальша циклізація та окислення утворює фурахіноцин C, який є відправною сполукою до утворення різноманітних фурахіноцинів, в тому числі ідентифікованих у цій роботі фурахіноцинів K та L.

Варто зазначити, що *fur* кластер містить ген, який має значну подібність до PLP-залежної амінотрансферази, незважаючи на відсутність стадії амінування у біосинтезі фурахіноцину. Isogai і співавтори виявили, що видалення гена амінотрансферази (*fur3*) припиняє синтез фурахіноцинів у гетерологічному штамі [88]. Крім того, експресія плазміди, яка містить гени *fur1*, *fur2* і *fur3*, привела до накопичення флавіоліну з аміногрупою. Таким чином, це демонструє, що ген *fur3*

активний та він може використовувати флавіолін як субстрат. У той же час, додавання аміно-флавіоліну до культури в якій ген *fur3* було видалено, відновлює гетерологічну продукцію фурахіоцину D. Ці сукупні результати свідчать про те, що *fur3* є необхідним для біосинтезу фурахіоцинів, а аміно-флавіолін може бути проміжним продуктом біосинтезу. Проте, це потребує більш детального дослідження, оскільки в такому випадку є необхідним додатковий крок дезамінування, для якого потрібний ген чи гени, функція яких ще не описана.

До сьогодні не було відомо жодного фурахіоцину з аміно групою чи Нітрогеном. Тому, дослідники припускали, що аміно-флавіолін може бути шунт-продуктом, який не пов'язаний з біосинтезом фурахіоцинів [143]. Однак, ми вперше ідентифікували фурахіоцин з Нітрогеном, який входить в дуже рідкісний серед природних сполук ацетилгідразоновий фрагмент. Наявність Нітрогену в структурі фурахіоцину частково підтверджує раніше висловлені припущення про амінування флавіоліну. Проте, для визначення функції гена *fur3* необхідні подальші дослідження, зокрема його інактивація у штамі-продуценті нітрогенвмісного фурахіоцину L. Крім того, подальші дослідження біосинтезу фурахіоцину L, а саме утворення ацетилгідразону, дозволять прояснити природу та механізми утворення гідразонвмісних сполук.

Виявлення нових природних сполук викликає інтерес не лише через унікальність хімічної структури, а й через потенційну їхню біологічну активність. Як відомо, природні сполуки актиноміцетного походження виявляють різноманітні біологічні активності. Для них притаманна антибіотична, протипаразитарна [209], протипухлинна [114], противірусна [119], імуносупресивна [210] та інші активності. Меротерпеноїдні антибіотики відомі своєю різноманітною біологічною активністю [72]. Для відомих фурахіоцинів властива цитотоксична активність, проте жоден з них не виявляє антимикробної дії. З огляду на структурні відмінності фурахіоцинів K та L, ми припустили, що модифікація нафталінового ядра може впливати на їхню активність. Фурахіоцин K не виявляв антимикробної активності, але продемонстрував цитотоксичність проти лінії клітин HerG2 так само, як описані фурахіоцини та їхні аналоги. Це

пояснюється незначною відмінністю в хімічних структурах, в якій різниця між фурахіноцинами С і К полягала в наявності метоксигрупи в позиції С-4. В той же час, фурахіноцин L виявляв антибактерійну активність, яка не описана на сьогодні для жодної сполуки цієї групи. Це може бути пов'язано з наявністю ацетилгідразону в його структурі, оскільки N–N-вмісні природні сполуки виявляють різноманітний спектр біологічної активності [23]. Отримані нами результати розширюють можливості використання фурахіноцинів не лише, як протипухлинних, а й потенційних антибактеріальних засобів.

Загалом, в цій роботі, ми дослідили філогенію актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* та оцінили їхній біосинтетичний потенціал як продуцентів біологічно активних сполук, головним чином антибіотиків. Узагальнена схема отриманих нами результатів представлена на рис. 4.1.. Визначення здатності продукувати антибіотичні сполуки здійснювали використовуючи два різних підходи скринінгу. Перший підхід, являє собою тотальний скринінг сполук через їхню антибіотичну активність. Інший підхід скринінгу, базувався на використанні мікробних біосенсорів для специфічного виявлення певних класів сполук. Застосовані підходи використовували на первинному етапі досліджень, щоб відібрати ізоляти-кандидати для виділення та ідентифікації сполук. Детектування сполук здійснювали шляхом дереплікативного аналізу екстрактів вторинних метаболітів, який включав їхнє порівняння в базі даних природних сполук. Сполуки, які не могли дереплікувати, вважали потенційно новими й очищали та визначали їхню хімічну структуру.

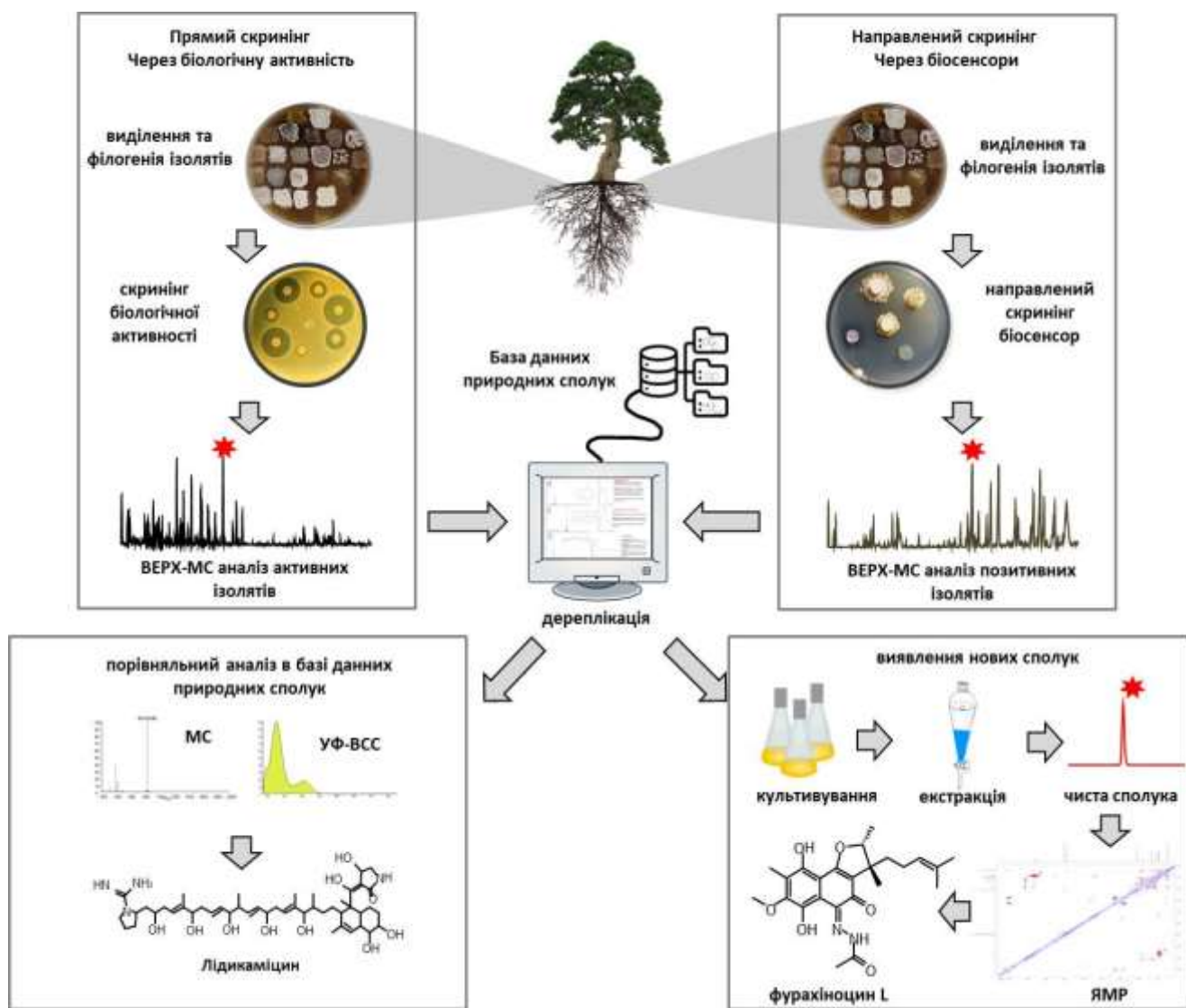


Рис. 4.1. Узагальнена схема оцінки біосинтетичного потенціалу актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*, застосованих в данній роботі.

Використання обох підходів скринінгу дали змогу виявити продуцентів двох нових антибіотиків фурахіноцинів К та L, а також низку відомих сполук, зокрема фармацевтично важливого антибіотика спіраміцину (рис. 4.2.).

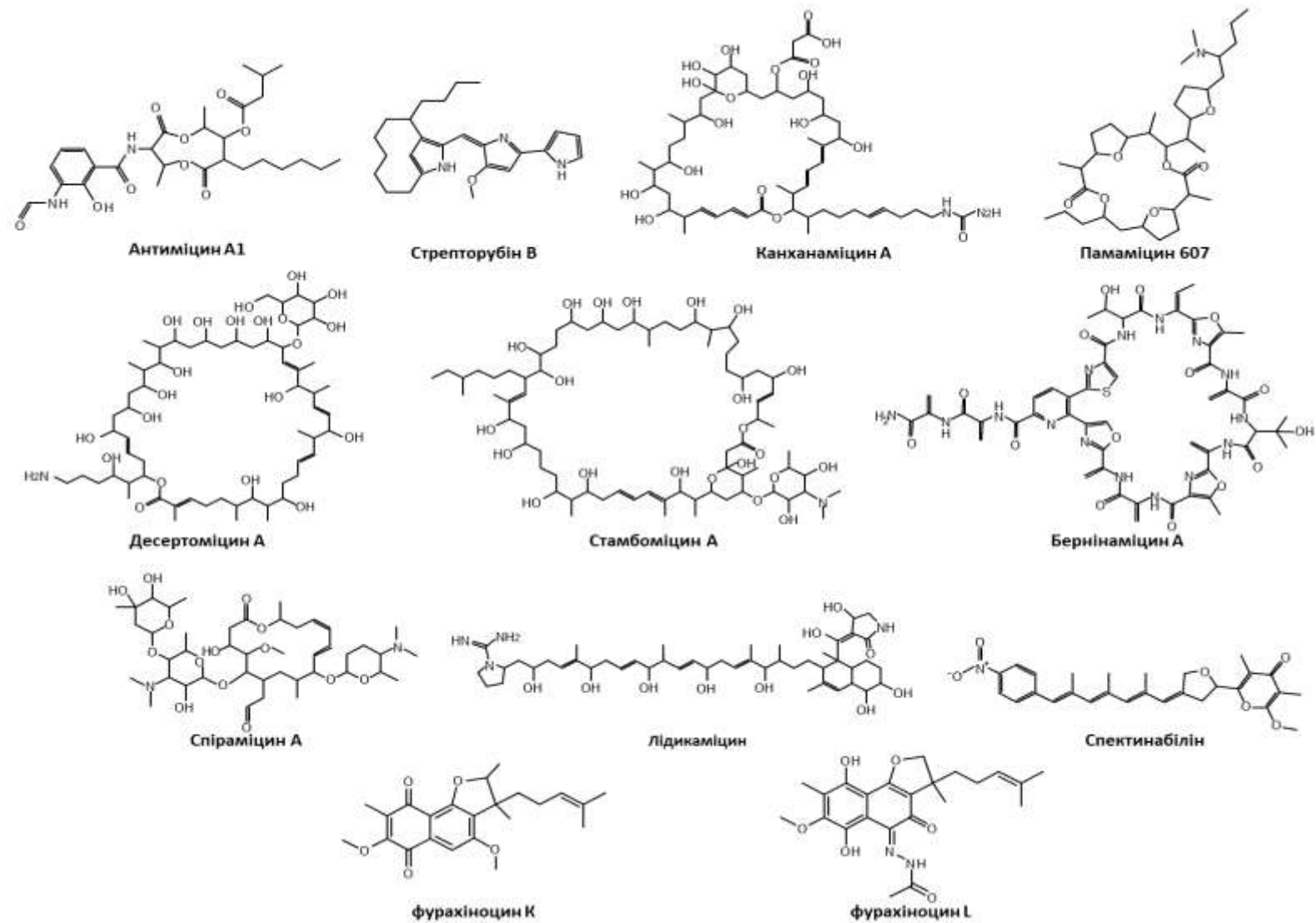


Рис. 4.2. Виявлені в цій роботі антибіотики шляхом дереплікативного та ЯМР-аналізів.

Аналіз результатів, одержаних під час дослідження мікробіоти невеликого біотопу, а саме ризосфери *J. excelsa* на території ПБК, розкриває перспективи для розвитку досліджень мікробного біорізноманіття усього Кримського півострова. На це вказує велике морфологічне різноманіття виділених актиноміцетів, серед яких представники значної кількості рідкісних родів актиноміцетів, які на момент початку роботи не виділяли з біотопів України. Деякі з виявлених родів вважають перспективним джерелом нових природних сполук. Широкий спектр біологічних властивостей досліджених ізолятів (антибактерійні, антифунгальні, фітостимулювальні) та варіативність їхнього поєднання в окремо взятій культурі відкривають перспективи широкого їхнього застосування як джерела антибіотиків медичного чи ветеринарного призначення, а також як платформи для розробки біопрепаратів для сільського господарства. В ході досліджень вдалося довести ефективність нового використання деяких біосенсорних штамів для направленою скринінгу певних класів антибіотиків серед природних ізолятів та виявити їх на території Кримського півострова. Надзвичайно важливим аспектом виконаної роботи є виявлення нових продуцентів цілої низки природних антибіотиків, серед яких присутні клінічно важливі сполуки, на основі яких вже розроблено терапевтичні препарати. Зрештою виявлення нових фурахіноцинів та з'ясування їхніх біологічних активностей доводить, що Кримський півострів, й актиноміцети, що його населяють, є надзвичайно перспективним джерелом нових природних сполук, дослідження якого необхідно розвивати надалі. Створена і частково досліджена колекція природних ізолятів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* може бути однією зі стартових платформ для розвитку мікробних біотехнологій в Україні.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі описано різноманіття та біосинтетичний потенціал актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*. Досліджено філогенію ізолятів та визначено їхню здатність продукувати біологічно активні сполуки. Виявлено продуцентів широкого спектру антибіотиків, в т.ч з використанням під час скринінгу специфічних мікробних біосенсорів. Відкрито два нові антибіотики нафтохінонової природи та досліджено їхню біологічну активність.

1. Актиноміцети, виділені з ризосфери *J. excelsa* в кількості 372 ізоляти, представлені 11 родами: *Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora* та *Streptomyces*.
2. Більше 40 % досліджених ізолятів, більшість з яких стрептоміцети, інгібували ріст умовно-патогенних бактерій і дріжджових грибів. Понад 60% ізолятів виступали антагоністами фітопатогенних грамнегативних паличок та пліснявих грибів.
3. Значна кількість актиноміцетних ізолятів виявляла фітостимулювальні властивості, такі як синтез ІОК, сидерофорів, солюбілізація нерозчинних форм Фосфору, асиміляція атмосферного азоту.
4. В результаті метаболічного профілювання окремих ізолятів за їхніми антимікробними активностями, виявлено та описано продуцентів антибіотиків десерторміцину А, канханаміцину А, стрепторубіну В, спектинабіліну (*Streptomyces* sp. Je 1-42); антиміцинів (*Streptomyces* sp. Je 1-93); спіраміцинів та стамбоміцинів (*Streptomyces* sp. Je 1-651).
5. Направлений скринінг природних сполук з використанням специфічних мікробних біосенсорних систем привів до виявлення продуцентів тіопептидних антибіотиків бернінаміцинів А і В (*Streptomyces* sp. Je 1-79 та Je 1-613), 31 потенційного продуцента антибіотиків-інгібіторів синтезу пептидоглікану, серед яких продуцент лідикаміцинів *Streptomyces* sp. Je 1-6 та 26 потенційних продуцентів памаміцинів.

6. Відкрито два нові меротерпеноїдні антибіотики фурахіноцини К та L (*Streptomyces* sp. Je 1-369), які мають в своїй структурі нафтохінон. Їхня особливість полягає у модифікаціях полікетид-нафтохінонового скелету, які раніше не були описані для фурахіноцинів. Ідентифікований кластер генів біосинтезу фурахіноцинів в ізоляті *Streptomyces* sp. Je 1-369 на 60% схожий з *fur* кластером штаму *Streptomyces* sp. КО-3988. Запропоновано ймовірний шлях біосинтезу фурахіноцинів К та L на основі наявних даних біосинтезу фурахіноцину С та подібних сполук. Фурахіноцин К виявляє цитотоксичну активність щодо клітинної лінії HepG2 на рівні 12,6 мкг/мл (IC50). Фурахіноцину L властива антибактеріальна активність проти грампозитивних бактерій *S. aureus* Newman (МІК на рівні 2 мкг/мл) та *B. subtilis* (МІК на рівні 64 мкг/мл), що виявлено вперше для фурахіноцинів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 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>
2. Abdel-Razek, A.S., El-Naggar, M.E., Allam, A., Morsy, O.M., Othman, S.I. (2020). Microbial natural products in drug discovery. *Processes*, 8(4), 470. <https://doi.org/10.3390/pr8040470>
3. Ahmed, Y., Rebets, Y., Estévez, M. R., Zapp, J., Myronovskyi, M., & Luzhetskyy, A. (2020). Engineering of *Streptomyces lividans* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial cell factories*, 19(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1277-8>
4. Aigle, B., Lautru, S., Spitteller, D., Dickschat, J. S., Challis, G. L., Leblond, P., & Pernodet, J. L. (2014). Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41(2), 251–263. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1379-y>
5. Alam, K., Mazumder, A., Sikdar, S., Zhao, Y. M., Hao, J., Song, C., Wang, Y., Sarkar, R., Islam, S., Zhang, Y., & Li, A. (2022). Streptomyces: The biofactory of secondary metabolites. *Frontiers in microbiology*, 13, 968053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.968053>
6. 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>
7. Almaarri, K., Alamir, L., Junaid, Y., & Xie, D.-Y. (2010). Volatile compounds from leaf extracts of *Juniperus excelsa* growing in Syria via gas chromatography mass spectrometry. *Analytical Methods*, 2(6), 673. <https://doi.org/10.1039/b9ay00256a>

8. Amin, D.H., Abdallah, N.A., Abolmaaty, A., Tolba, S., & Wellington, E.M.H. (2020). Microbiological and molecular insights on rare Actinobacteria harboring bioactive prospective. *Bull Natl Res Cent*, 44:5. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0266-8>
9. Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
10. Atlas, R. (1997). Principles of microbiology. 1298, WCB McGraw-Hill, New York, NY
11. Austin, M. B., Izumikawa, M., Bowman, M. E., Udvary, D. W., Ferrer, J. L., Moore, B. S., & Noel, J. P. (2004). Crystal structure of a bacterial type III polyketide synthase and enzymatic control of reactive polyketide intermediates. *The Journal of biological chemistry*, 279(43), 45162–45174. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406567200>
12. Bagley, M. C., Dale, J. W., Merritt, E. A., & Xiong, X. (2005). Thiopeptide antibiotics. *Chemical reviews*, 105(2), 685–714. <https://doi.org/10.1021/cr0300441>
13. Bai, C., Zhang, Y., Zhao, X., Hu, Y., Xiang, S., Miao, J., Lou, C., & Zhang, L. (2015). Exploiting a precise design of universal synthetic modular regulatory elements to unlock the microbial natural products in *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(39), 12181–12186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511027112>
14. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
15. 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>

16. Bauman, K. D., Butler, K. S., Moore, B. S., & Chekan, J. R. (2021). Genome mining methods to discover bioactive natural products. *Natural product reports*, 38(11), 2100–2129. <https://doi.org/10.1039/d1np00032b>
17. 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>
18. Bellenger, J.P., Darnajoux, R., Zhang, X., & Kraepiel, A.M.L. (2020). Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in terrestrial ecosystems: a review. *Biogeochem*, 149, 53–73. <https://doi.org/10.1007/s10533-020-00666-7>
19. Bennett, J. W., & Bentley, R. (2000). Seeing red: the story of prodigiosin. *Advances in applied microbiology*, 47, 1–32. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(00\)47000-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(00)47000-0)
20. Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., ... Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), 141–147. <https://doi.org/10.1038/417141a>
21. 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>
22. Bibb M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current opinion in microbiology*, 8(2), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.016>
23. Blair, L. M., & Sperry, J. (2013). Natural products containing a nitrogen-nitrogen bond. *Journal of natural products*, 76(4), 794–812. <https://doi.org/10.1021/np400124n>
24. Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., Fetter, A., Terlouw, B. R., Metcalf, W. W., Helfrich, E. J. N., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2023). antiSMASH 7.0: new and improved

- predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic acids research*, 51(W1), W46–W50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>
25. 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>
26. Boubetra, D., Sabaou, N., Zitouni, A., Bijani, C., Lebrihi, A., & Mathieu, F. (2013). Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiological research*, 168(4), 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.11.005>
27. 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>
28. Buckingham, J. (1993). Dictionary of Natural Products. CRC Press, London
29. Bull, A. T., Idris, H., Sanderson, R., Asenjo, J., Andrews, B., & Goodfellow, M. (2018). High altitude, hyper-arid soils of the Central-Andes harbor mega-diverse communities of actinobacteria. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 22(1), 47–57. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0976-5>
30. Bunsangiam, S., Thongpae, N., Limtong, S., & Srisuk, N. (2021). Large scale production of indole-3-acetic acid and evaluation of the inhibitory effect of indole-3-acetic acid on weed growth. *Scientific reports*, 11(1), 13094. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92305-w>
31. Burg, R. W., Miller, B. M., Baker, E. E., Birnbaum, J., Currie, S. A., Hartman, R., Kong, Y. L., Monaghan, R. L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J. B., Wallick, H., Stapley, E. O., Oiwa, R., & Omura, S. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 15(3), 361–367. <https://doi.org/10.1128/AAC.15.3.361>
32. Campbell, W. C., Fisher, M. H., Stapley, E. O., Albers-Schönberg, G., & Jacob, T. A. (1983). Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science (New York, N.Y.)*, 221(4613), 823–828. <https://doi.org/10.1126/science.6308762>

33. Cao, Y. R., He, Z. K., Guo, Y., Yang, X. X., & Liang, L. M. (2018). *Actinorectispora metalli* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a mine and emended description of the genus *Actinorectispora*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(4), 1023–1027. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002620>
34. 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>
35. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>
36. Chaiya, L., Kumla, J., Suwannarach, N., Kiatsiriroat, T., & Lumyong, S. (2021). Isolation, characterization, and efficacy of *Actinobacteria* associated with arbuscular mycorrhizal spores in promoting plant growth of Chili (*Capsicum flutescens* L.). *Microorganisms*, 9(6), 1274. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061274>
37. Challis, G. L., & Hopwood, D. A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl 2(Suppl 2), 14555–14561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1934677100>
38. Chavali, A. K., & Rhee, S. Y. (2018). Bioinformatics tools for the identification of gene clusters that biosynthesize specialized metabolites. *Briefings in bioinformatics*, 19(5), 1022–1034. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx020>
39. Choudoir, M. J., Doroghazi, J. R., & Buckley, D. H. (2016). Latitude delineates patterns of biogeography in terrestrial *Streptomyces*. *Environmental microbiology*, 18(12), 4931–4945. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13420>
40. Christenson, J. K., Richman, J. E., Jensen, M. R., Neufeld, J. Y., Wilmot, C. M., & Wackett, L. P. (2017). β -Lactone synthetase found in the olefin biosynthesis

pathway. *Biochemistry*, 56(2), 348–351.

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01199>

41. 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>
42. 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>
43. Coates, A. R., Halls, G., & Hu, Y. (2011). Novel classes of antibiotics or more of the same?. *British journal of pharmacology*, 163(1), 184–194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x>
44. Cross, T., & Goodfellow, M. (1973). Taxonomy and classification of the actinomycetes. *Society for Applied Bacteriology symposium series*, 2, 11–112.
45. Dairi T. (2005). Studies on biosynthetic genes and enzymes of isoprenoids produced by actinomycetes. *The Journal of antibiotics*, 58(4), 227–243. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.27>
46. Das, R., Romi, W., Das, R., Sharma, H. K., & Thakur, D. (2018). Antimicrobial potentiality of actinobacteria isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. *BMC microbiology*, 18(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1215-7>
47. Dastager, S., Dayanand, L.W.J.A., Tang, S.K., Tian, X.P., Zhi, X.Y., Xu, L.H., & Jiang, C. (2006). Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *African Journal of Biotechnology*, 5, 1131–1134.
48. De la Cruz, M., González, I., Parish, C. A., Onishi, R., Tormo, J. R., Martín, J., Peláez, F., Zink, D., El Aouad, N., Reyes, F., Genilloud, O., & Vicente, F. (2017). Production of ramoplanin and ramoplanin analogs by actinomycetes. *Frontiers in microbiology*, 8, 343. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00343>
49. De La Hoz-Romo, M. C., Díaz, L., & Villamil, L. (2022). Marine *Actinobacteria* a new source of antibacterial metabolites to treat Acne Vulgaris disease - A

- systematic literature review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(7), 965. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070965>
50. De Paepe, B., Peters, G., Coussement, P., Maertens, J., & De Mey, M. (2017). Tailor-made transcriptional biosensors for optimizing microbial cell factories. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 44(4-5), 623–645. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1862-3>
51. 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>
52. Degiacomi, G., Personne, Y., Mondésert, G., Ge, X., Mandava, C. S., Hartkoorn, R. C., Boldrin, F., Goel, P., Peisker, K., Benjak, A., Barrio, M. B., Ventura, M., Brown, A. C., Leblanc, V., Bauer, A., Sanyal, S., Cole, S. T., Lagrange, S., Parish, T., & Manganelli, R. (2016). Micrococcin P1 - A bactericidal thiopeptide active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 100, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.07.011>
53. Devanshi, S., R. Shah, K., Arora, S., & Saxena, S. (2022). Actinomycetes as An Environmental Scrubber. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99187>
54. 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>
55. 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>
56. Ding, T., Yang, L. J., Zhang, W. D., & Shen, Y. H. (2019). The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity. *RSC advances*, 9(38), 21964–21988. <https://doi.org/10.1039/c9ra03579f>
57. Donald, L., Pipite, A., Subramani, R., Owen, J., Keyzers, R.A., & Taufa, T. (2022) *Streptomyces*: Still the biggest producer of new natural secondary

- metabolites, a current perspective. *Microbiology Research*, 13(3), 418-465.
<https://doi.org/10.3390/microbiolres13030031>
58. Doroghazi, J. R., & Metcalf, W. W. (2013). Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC genomics*, 14, 611. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-611>
59. Ebrahimi-Zarandi, M., Saberi Riseh, R., & Tarkka, M. T. (2022). Actinobacteria as effective biocontrol agents against plant pathogens, an overview on their role in eliciting plant defense. *Microorganisms*, 10(9), 1739. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091739>
60. 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>
61. 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>
62. Farda, B., Djebaili, R., Vaccarelli, I., Del Gallo, M., & Pellegrini, M. (2022). Actinomycetes from caves: An overview of their diversity, biotechnological properties, and insights for their use in soil environments. *Microorganisms*, 10(2), 453. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020453>
63. Fernández, M., & Sánchez, J. (2002). Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 2), 405–412. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-405>
64. Fischer, H. P., Brunner, N. A., Wieland, B., Paquette, J., Macko, L., Ziegelbauer, K., & Freiberg, C. (2004). Identification of antibiotic stress-inducible promoters: a systematic approach to novel pathway-specific reporter assays for antibacterial drug discovery. *Genome research*, 14(1), 90–98. <https://doi.org/10.1101/gr.1275704>

65. 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>
66. Foulston L. (2019). Genome mining and prospects for antibiotic discovery. *Current opinion in microbiology*, 51, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.01.001>
67. Gavriilidou, A., Kautsar, S. A., Zaburannyi, N., Krug, D., Müller, R., Medema, M. H., & Ziemert, N. (2022). Compendium of specialized metabolite biosynthetic diversity encoded in bacterial genomes. *Nature microbiology*, 7(5), 726–735. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01110-2>
68. Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and applied microbiology*, 38(4), 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>
69. Gläser, L., Kuhl, M., Stegmüller, J., Rückert, C., Myronovskyi, M., Kalinowski, J., Luzhetskyy, A., & Wittmann, C. (2021). Superior production of heavy pamamycin derivatives using a bkdR deletion mutant of *Streptomyces albus* J1074/R2. *Microbial cell factories*, 20(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01602-6>
70. 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>
71. Goodfellow, M., Nouioui, I., Sanderson, R., Xie, F., & Bull, A. T. (2018). Rare taxa and dark microbial matter: novel bioactive actinobacteria abundant in Atacama Desert soils. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(8), 1315–1332. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1088-7>
72. Gozari, M., Alborz, M., El-Seedi, H. R., & Jassbi, A. R. (2021). Chemistry, biosynthesis and biological activity of terpenoids and meroterpenoids in bacteria and fungi isolated from different marine habitats. *European journal of medicinal chemistry*, 210, 112957. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112957>

73. Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., & Huang, Y. (2008). A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(Pt 1), 149–159. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65224-0>
74. Haagen, Y., Glück, K., Fay, K., Kammerer, B., Gust, B., & Heide, L. (2006). A gene cluster for prenylated naphthoquinone and prenylated phenazine biosynthesis in *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 7(12), 2016–2027. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600338>
75. 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
76. Hashimoto, M., Katsura, H., Kato, R., Kawaide, H., & Natsume, M. (2011). Effect of pamamycin-607 on secondary metabolite production by *Streptomyces* spp. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(9), 1722–1726. <https://doi.org/10.1271/bbb.110251>
77. Hayakawa, Y., Kanamaru, N., Morisaki, N., Seto, H., & Furihata, K. (1991). Structure of lydicamycin, a new antibiotic of a novel skeletal type. *Tetrahedron Letters*, 32(2), 213–216. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)80858-4](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)80858-4)
78. Heide, L. (2009). Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(2), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.02.020>
79. 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>

- 80.Higo, A., Hara, H., Horinouchi, S., & Ohnishi, Y. (2012). Genome-wide distribution of AdpA, a global regulator for secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces*, revealed the extent and complexity of the AdpA regulatory network. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 19(3), 259–273. <https://doi.org/10.1093/dnares/dss010>
- 81.Hug, J. J., Bader, C. D., Remškar, M., Cirnski, K., & Müller, R. (2018). Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 7(2), 44. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020044>
- 82.Hughes, R. A., & Moody, C. J. (2007). From amino acids to heteroaromatics--thiopeptide antibiotics, nature's heterocyclic peptides. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 46(42), 7930–7954. <https://doi.org/10.1002/anie.200700728>
- 83.Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- 84.Idris, H., Goodfellow, M., Sanderson, R., Asenjo, J. A., & Bull, A. T. (2017). Actinobacterial rare biospheres and dark matter revealed in habitats of the chilean Atacama Desert. *Scientific reports*, 7(1), 8373. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08937-4>
- 85.Igarashi, Y., Mogi, T., Yanase, S., Miyanaga, S., Fujita, T., Sakurai, H., Saiki, I., & Ohsaki, A. (2009). Brartemicin, an inhibitor of tumor cell invasion from the actinomycete *Nonomuraea* sp. *Journal of natural products*, 72(5), 980–982. <https://doi.org/10.1021/np9000575>
- 86.Iniyan, A. M., Sudarman, E., Wink, J., Kannan, R. R., & Vincent, S. G. P. (2019). Ala-geninthiocin, a new broad spectrum thiopeptide antibiotic, produced by a marine *Streptomyces* sp. ICN19. *The Journal of antibiotics*, 72(2), 99–105. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0115-2>

87. Ishibashi, M., Funayama, S., Anraku, Y., Komiyama, K., & Omura, S. (1991). Novel antibiotics, furaquinocins C, D, E, F, G and H. *The Journal of antibiotics*, 44(4), 390–395. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.44.390>
88. Isogai, S., Nishiyama, M., & Kuzuyama, T. (2012). Identification of 8-amino-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione, a novel intermediate in the biosynthesis of Streptomyces meroterpenoids. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(18), 5823–5826. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.07.084>
89. Isshiki, K., Tamamura, T., Sawa, T., Naganawa, H., Takeuchi, T., & Umezawa, H. (1986). Biosynthetic studies of terpentecin. *The Journal of antibiotics*, 39(11), 1634–1635. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.1634>
90. 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.
91. Janso, J. E., & Carter, G. T. (2010). Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. *Applied and environmental microbiology*, 76(13), 4377–4386. <https://doi.org/10.1128/AEM.02959-09>
92. Jiang, Y., Li, Q., Chen, X., & Jiang, C. (2016). Isolation and cultivation methods of Actinobacteria. In Tech. <https://doi.org/10.5772/61457>
93. Joynt, R., & Seipke, R. F. (2018). A phylogenetic and evolutionary analysis of antimycin biosynthesis. *Microbiology (Reading, England)*, 164(1), 28–39. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000572>
94. Kagamizono, T., Kawashima, A., Kishimura, Y., Yamagishi, M., Tsuchida, Y., Kondo, H., & Hanada, K. (1993). PI-220, a New Platelet Aggregation Inhibitor. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(5), 766–769. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.766>
95. Kakinuma, K., Hanson, C.A., & Rinehart, K.L. (1976). Spectinabilin, a new nitro-containing metabolite isolated from streptomyces spectabilis. *Tetrahedron*, 32(2), 217–222. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(76\)87004-4](https://doi.org/10.1016/0040-4020(76)87004-4)

96. Katz, L., & Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 43(2-3), 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>
97. Kautsar, S. A., Blin, K., Shaw, S., Navarro-Muñoz, J. C., Terlouw, B. R., van der Hooft, J. J. J., van Santen, J. A., Tracanna, V., Suarez Duran, H. G., Pascal Andreu, V., Selem-Mojica, N., Alanjary, M., Robinson, S. L., Lund, G., Epstein, S. C., Sisto, A. C., Charkoudian, L. K., Collemare, J., Linington, R. G., Weber, T., ... Medema, M. H. (2020). MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function. *Nucleic acids research*, 48(D1), D454–D458. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz882>
98. Kawahara, T., Nagai, A., Takagi, M., & Shin-ya, K. (2012). A new furaquinocin derivative, JBIR-136, from *Streptomyces* sp. 4963H2. *The Journal of antibiotics*, 65(11), 579–581. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.72>
99. Kawasaki, T., Hayashi, Y., Kuzuyama, T., Furihata, K., Itoh, N., Seto, H., & Dairi, T. (2006). Biosynthesis of a natural polyketide-isoprenoid hybrid compound, furaquinocin A: identification and heterologous expression of the gene cluster. *Journal of bacteriology*, 188(4), 1236–1244. <https://doi.org/10.1128/JB.188.4.1236-1244.2006>
100. Kaysser, L., Bernhardt, P., Nam, S. J., Loesgen, S., Ruby, J. G., Skewes-Cox, P., Jensen, P. R., Fenical, W., & Moore, B. S. (2012). Merochlorins A-D, cyclic meroterpenoid antibiotics biosynthesized in divergent pathways with vanadium-dependent chloroperoxidases. *Journal of the American Chemical Society*, 134(29), 11988–11991. <https://doi.org/10.1021/ja305665f>
101. Kears, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

102. Kim, I.S., Kang, S.G., Lee, K.J. (1995). Physiological importance of trypsin like protease during morphological differentiation of *Streptomyces* spp. *Journal of Microbiology*, 33, 315–321.
103. 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>
104. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
105. Komiyama, K., Funayama, S., Anraku, Y., Ishibashi, M., Takahashi, Y., & Omura, S. (1990). Novel antibiotics, furaquinocins A and B. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *The Journal of antibiotics*, 43(3), 247–252. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.43.247>
106. Kresge, N., Simoni, R.D., & Hill, R.L. (2004). Selman Waksman: the father of antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48): p. e7-e7. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)67861-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)67861-9)
107. 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>
108. Kucho, K.-I., Tobita, H., Utsumi, S., Uchiumi, T., & Yamanaka, T. (2022). Biology of actinorhizal symbiosis from genomics to ecology: the 20th International Meeting on Frankia and Actinorhizal Plants. *Journal of Forest Research*, 27(2), 96-99. <https://doi.org/10.1080/13416979.2022.2036417>
109. Kumano, T., Tomita, T., Nishiyama, M., & Kuzuyama, T. (2010). Functional characterization of the promiscuous prenyltransferase responsible for furaquinocin biosynthesis: identification of a physiological polyketide substrate and its prenylated reaction products. *The Journal of biological chemistry*, 285(51), 39663–39671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.153957>

110. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
111. Labro, M.T. (1993). Pharmacology of Spiramycin. *Drug Invest 6 (Suppl 1)*, 15–28. <https://doi.org/10.1007/BF03258433>
112. Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms*, 10(3), 596. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
113. Lasch, C., Stierhof, M., Estévez, M. R., Myronovskyi, M., Zapp, J., & Luzhetskyy, A. (2020). Dudomycins: New Secondary Metabolites Produced After Heterologous Expression of an Nrps Cluster from *Streptomyces albus* ssp. *Chlorinus* Nrrl B-24108. *Microorganisms*, 8(11), 1800. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111800>
114. Law, J. W., Law, L. N., Letchumanan, V., Tan, L. T., Wong, S. H., Chan, K. G., Ab Mutalib, N. S., & Lee, L. H. (2020). Anticancer Drug Discovery from Microbial Sources: The Unique Mangrove Streptomyces. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22), 5365. <https://doi.org/10.3390/molecules25225365>
115. Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., & Marinelli, F. (2000). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(3-4), 399–405.
116. Lee, N., Kim, W., Hwang, S., Lee, Y., Cho, S., Palsson, B., & Cho, B. K. (2020). Thirty complete *Streptomyces* genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Scientific data*, 7(1), 55. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0395-9>
117. Lefèvre, P., Peirs, P., Braibant, M., Fauville-Dufaux, M., Vanhoof, R., Huygen, K., Wang, X. M., Pogell, B., Wang, Y., Fischer, P., Metz, P., & Content, J. (2004). Antimycobacterial activity of synthetic pamamycins. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(4), 824–827. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh402>

118. Lewin, G. R., Carlos, C., Chevrette, M. G., Horn, H. A., McDonald, B. R., Stankey, R. J., Fox, B. G., & Currie, C. R. (2016). Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. *Annual review of microbiology*, 70, 235–254. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095748>
119. Li, F., Chen, D., Lu, S., Yang, G., Zhang, X., Chen, Z., Fan, S., Wu, S., & He, J. (2018). Anti-Influenza A Viral Butenolide from *Streptomyces* sp. Smu03 Inhabiting the Intestine of *Elephas maximus*. *Viruses*, 10(7), 356. <https://doi.org/10.3390/v10070356>
120. Li, J., Qu, X., He, X., Duan, L., Wu, G., Bi, D., Deng, Z., Liu, W., & Ou, H. Y. (2012). ThioFinder: a web-based tool for the identification of thiopeptide gene clusters in DNA sequences. *PloS one*, 7(9), e45878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045878>
121. Liu, Z., Zhao, Y., Huang, C., & Luo, Y. (2021). Recent advances in silent gene cluster activation in *Streptomyces*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 632230. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.632230>
122. Lobo, C. B., Juárez Tomás, M. S., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E. (2019). Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological research*, 219, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>
123. Locci, R., & Schaal, K. P. (1980). Apical growth in facultative Anaerobic actinomycetes as determined by immunofluorescent labeling. *Zentralblatt fur Bakteriologie. I. Abt. Originale. A: Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 246(1), 112–118.
124. 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>
125. Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Buss, H.J., Trujillo, M.E., Kämpfer, P., & Whiteman, W.B. (2012). Road map of the phylum

- Actinobacteria. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 1–28. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4_1
126. 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>
127. Luo, Y., Cobb, R. E., & Zhao, H. (2014). Recent advances in natural product discovery. *Current opinion in biotechnology*, 30, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.09.002>
128. Ma, G. L., Candra, H., Pang, L. M., Xiong, J., Ding, Y., Tran, H. T., Low, Z. J., Ye, H., Liu, M., Zheng, J., Fang, M., Cao, B., & Liang, Z. X. (2022). Biosynthesis of tasikamides via pathway coupling and diazonium-mediated hydrazone formation. *Journal of the American Chemical Society*, 144(4), 1622–1633. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c10369>
129. 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>
130. Makitrynskyy, R., Ostash, B., Tsypik, O., Rebets, Y., Doud, E., Meredith, T., Luzhetskyy, A., Bechthold, A., Walker, S., & Fedorenko, V. (2013). Pleiotropic regulatory genes *bldA*, *adpA* and *absB* are implicated in production of phosphoglycolipid antibiotic moenomycin. *Open biology*, 3(10), 130121. <https://doi.org/10.1098/rsob.130121>
131. Malcolmson, S. J., Young, T. S., Ruby, J. G., Skewes-Cox, P., & Walsh, C. T. (2013). The posttranslational modification cascade to the thiopeptide berninamycin generates linear forms and altered macrocyclic scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21), 8483–8488. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307111110>
132. Manigundan, K., Radhakrishnan, M., Kishore, K.A., & Jerrine, J. (2023). Actinobacteria as a source of biofertilizer/biocontrol agents for bio-organic

- agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, 134(2), 1xac0407. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac047>
133. Manivasagan, P., Kang, K. H., Sivakumar, K., Li-Chan, E. C., Oh, H. M., & Kim, S. K. (2014). Marine actinobacteria: an important source of bioactive natural products. *Environmental toxicology and pharmacology*, 38(1), 172–188. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.014>
134. Manteca, Á., & Yagüe, P. (2019). *Streptomyces* as a source of antimicrobials: Novel approaches to activate cryptic secondary metabolite pathways. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81812>
135. Mascher, T., Zimmer, S. L., Smith, T. A., & Helmann, J. D. (2004). Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(8), 2888–2896. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.2888-2896.2004>
136. Mast, Y., & Stegmann, E. (2019). Actinomycetes: The Antibiotics Producers. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8(3), 105. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030105>
137. Matsumoto, A., & Takahashi, Y. (2017). Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *The Journal of antibiotics*, 70(5), 514–519. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.20>
138. McCann, P. A., & Pogell, B. M. (1979). Pamamycin: a new antibiotic and stimulator of aerial mycelia formation. *The Journal of antibiotics*, 32(7), 673–678. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.32.673>
139. Méndez, C., Braña, A. F., Manzanal, M. B., & Hardisson, C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Canadian journal of microbiology*, 31(5), 446–450. <https://doi.org/10.1139/m85-083>
140. Miguélez, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of cell biology*, 145(3), 515–525. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.3.515>

141. Moein, M., Hatam, G., Taghavi-Moghadam, R., & Zarshenas, M. M. (2017). Antileishmanial activities of Greek juniper (*Juniperus excelsa* M.Bieb.) against *Leishmania major* promastigotes. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(1), 31–36. <https://doi.org/10.1177/2156587215623435>
142. Mukai, A., Fukai, T., Hoshino, Y., Yazawa, K., Harada, K., & Mikami, Y. (2009). Nocardithiocin, a novel thiopeptide antibiotic, produced by pathogenic *Nocardia pseudobrasiliensis* IFM 0757. *The Journal of antibiotics*, 62(11), 613–619. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.90>
143. Murray, L. A. M., McKinnie, S. M. K., Moore, B. S., & George, J. H. (2020). Meroterpenoid natural products from *Streptomyces* bacteria - the evolution of chemoenzymatic syntheses. *Natural product reports*, 37(10), 1334–1366. <https://doi.org/10.1039/d0np00018c>
144. 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>
145. Myronovskyy, M., Rosenkränzer, B., Nadmid, S., Pujic, P., Normand, P., & Luzhetskyy, A. (2018). Generation of a cluster-free *Streptomyces albus* chassis strains for improved heterologous expression of secondary metabolite clusters. *Metabolic engineering*, 49, 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.09.004>
146. Myronovskyy, M., Ostash, B., Ostash, I., & Fedorenko, V. (2009). A gene cloning system for the siomycin producer *Streptomyces sioyaensis* NRRL-B5408. *Folia microbiologica*, 54(2), 91–96. <https://doi.org/10.1007/s12223-009-0013-x>
147. Natsume, M., Kondo, S., & Marumo, S. (1989). The absolute stereochemistry of pamamycin-607, an aerial mycelium-inducing substance of *Streptomyces alboniger*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 24, 1911–1913.

148. Nazir, M., Saleem, M., Tousif, M. I., Anwar, M. A., Surup, F., Ali, I., Wang, D., Mamadalieva, N. Z., Alshammari, E., Ashour, M. L., Ashour, A. M., Ahmed, I., Elizbit, Green, I. R., & Hussain, H. (2021). Meroterpenoids: A comprehensive update insight on structural diversity and biology. *Biomolecules*, *11*(7), 957. <https://doi.org/10.3390/biom11070957>
149. 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>
150. Nguyen, C. T., Dhakal, D., Pham, V. T. T., Nguyen, H. T., & Sohng, J. K. (2020). Recent advances in strategies for activation and discovery/characterization of cryptic biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Microorganisms*, *8*(4), 616. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040616>
151. Nguyen, K. T., Tenor, J., Stettler, H., Nguyen, L. T., Nguyen, L. D., & Thompson, C. J. (2003). Colonial differentiation in *Streptomyces coelicolor* depends on translation of a specific codon within the *adpA* gene. *Journal of bacteriology*, *185*(24), 7291–7296. <https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7291-7296.2003>
152. Oberhofer, M., Hess, J., Leutgeb, M., Gössnitzer, F., Rattei, T., Wawrosch, C., & Zotchev, S. B. (2019). Exploring *Actinobacteria* associated with rhizosphere and endosphere of the native alpine medicinal plant *Leontopodium nivale* subspecies *alpinum*. *Frontiers in microbiology*, *10*, 2531. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02531>
153. O'Neill, E. C., Schorn, M., Larson, C. B., & Millán-Aguñaga, N. (2019). Targeted antibiotic discovery through biosynthesis-associated resistance determinants: target directed genome mining. *Critical reviews in microbiology*, *45*(3), 255–277. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1590307>
154. Panthee, S., Takahashi, S., Takagi, H., Nogawa, T., Oowada, E., Uramoto, M., & Osada, H. (2011). Furaquinocins I and J: novel polyketide isoprenoid hybrid compounds from *Streptomyces reveromyceticus* SN-593. *The Journal of antibiotics*, *64*(7), 509–513. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.41>

155. Parenti, F., Beretta, G., Berti, M., & Arioli, V. (1978). Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. I. Description of the producer strain, fermentation studies and biological properties. *The Journal of antibiotics*, 31(4), 276–283. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.31.276>
156. Parthasarathy, R., Monette, C. E., Bracero, S., & Saha, S.M. (2018). Methods for field measurement of antibiotic concentrations: limitations and outlook. *FEMS microbiology ecology*, 94(8), 10.1093/femsec/fiy105. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy105>
157. Pathirana, C., Jensen, P. R., & Fenical, W. (1992). Marinone and debromomarinone: Antibiotic sesquiterpenoid naphthoquinones of a new structure class from a marine bacterium. *Tetrahedron Letters*, 33(50), 7663–7666. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(93\)88010-g](https://doi.org/10.1016/0040-4039(93)88010-g)
158. Paulus, C., Gromyko, O., & Luzhetskyy, A. (2021). New kendomycin derivative isolated from *Streptomyces* sp. Cl 58-27. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(22), 6834. <https://doi.org/10.3390/molecules26226834>
159. Paulus, C., Myronovskyi, M., Zapp, J., Rodríguez Estévez, M., Lopatniuk, M., Rosenkränzer, B., Paluszczak, A., & Luzhetskyy, A. (2022). Miramides A-D: identification of detoxin-like depsipeptides after heterologous expression of a hybrid NRPS-PKS gene cluster from *Streptomyces mirabilis* Lu17588. *Microorganisms*, 10(9), 1752. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091752>
160. Pawlik, K., Kotowska, M., Chater, K. F., Kuczek, K., & Takano, E. (2007). A cryptic type I polyketide synthase (cpk) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Archives of microbiology*, 187(2), 87–99. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0176-7>
161. Peek, J., Lilic, M., Montiel, D., Milshteyn, A., Woodworth, I., Biggins, J. B., Ternei, M. A., Calle, P. Y., Danziger, M., Warriar, T., Saito, K., Braffman, N., Fay, A., Glickman, M. S., Darst, S. A., Campbell, E. A., & Brady, S. F. (2018). Rifamycin congeners kanglemycins are active against rifampicin-resistant bacteria via a distinct mechanism. *Nature communications*, 9(1), 4147. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06587-2>

162. Prauser, H., Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. (1970). Description of *Oerskovia* gen. n. to harbor Orskov's motile nocardia. *Applied microbiology*, 19(3), 534. <https://doi.org/10.1128/am.19.3.534-534.1970>
163. Price, B., Adamidis, T., Kong, R., & Champness, W. (1999). A *Streptomyces coelicolor* antibiotic regulatory gene, *absB*, encodes an RNase III homolog. *Journal of bacteriology*, 181(19), 6142–6151. <https://doi.org/10.1128/JB.181.19.6142-6151.1999>
164. Procópio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L., & Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 16(5), 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
165. Quadri, S. R., Tian, X. P., Zhang, J., Ruwaili, J. A., Hozzein, W. N., Agsar, D., Li, W. J., & Dastager, S. G. (2016). *Actinorectispora indica* gen. nov., sp. nov. isolated from soil, a member of the family *Pseudonocardiaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(2), 939–945. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000814>
166. Raju, R., Gromyko, O., Andriy, B., Fedorenko, V., Luzhetskyy, A., & Müller, R. (2014). Oleamycins A and B: new antibacterial cyclic hexadepsipeptides isolated from a terrestrial *Streptomyces* sp. *The Journal of antibiotics*, 67(4), 339–343. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.1>
167. Raju, R., Gromyko, O., Fedorenko, V., Herrmannet, J., Luzhetskyy, A., & Müller, R. (2013) Rubimycinone A, a new anthraquinone from a terrestrial *Streptomyces* sp. *Tetrahedron Letter*, 54(8), 900–902. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.11.130>
168. Raju, R., Gromyko, O., Fedorenko, V., Luzhetskyy, A., & Müller, R. (2013). Oleaceran: a novel spiro[isobenzofuran-1,2'-naphtho[1,8-bc]furan] isolated from a terrestrial *Streptomyces* sp. *Organic letters*, 15(14), 3487–3489. <https://doi.org/10.1021/ol401490u>
169. Raju, R., Gromyko, O., Fedorenko, V., Luzhetskyy, A., Plaza, A., & Müller, R. (2012). Juniperolide A: a new polyketide isolated from a terrestrial

- actinomycete, *Streptomyces* sp. *Organic letters*, 14(23), 5860–5863.
<https://doi.org/10.1021/ol302766z>
170. Raju, R., Gromyko, O., Fedorenko, V., Luzketskyy, A., & Müller, R. (2015). Albaflavenol B, a new sesquiterpene isolated from the terrestrial actinomycete, *Streptomyces* sp. *The Journal of antibiotics*, 68(4), 286–288.
<https://doi.org/10.1038/ja.2014.138>
171. Raju, R., Gromyko, O., Fedorenko, V., Luzketskyy, A., & Müller, R. (2012) Leopolic acid A, isolated from a terrestrial actinomycete, *Streptomyces* sp.. *Tetrahedron Letter*, 53, 6300–6301.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.09.046>
172. Ranieri, M. R. M., Chan, D. C. K., Yaeger, L. N., Rudolph, M., Karabelas-Pittman, S., Abdo, H., Chee, J., Harvey, H., Nguyen, U., & Burrows, L. L. (2019). Thiostrepton hijacks pyoverdine receptors to inhibit growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(9), e00472-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00472-19>
173. Rateb, M. E., Ebel, R., & Jaspars, M. (2018). Natural product diversity of actinobacteria in the Atacama Desert. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(8), 1467–1477. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1030-z>
174. Rebets, Y., Schmelz, S., Gromyko, O., Tistechok, S., Petzke, L., Scrima, A., & Luzhetskyy, A. (2018). Design, development and application of whole-cell based antibiotic-specific biosensor. *Metabolic engineering*, 47, 263–270.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.019>
175. Revilla-Guarinos, A., Dürr, F., Popp, P. F., Döring, M., & Mascher, T. (2020). Amphotericin B specifically induces the two-component system LnrJK: Development of a novel whole-cell biosensor for the detection of amphotericin-like polyenes. *Frontiers in microbiology*, 11, 2022.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02022>
176. Rigali, S., Nothaft, H., Noens, E. E., Schlicht, M., Colson, S., Müller, M., Joris, B., Koerten, H. K., Hopwood, D. A., Titgemeyer, F., & van Wezel, G. P. (2006). The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is

- regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molecular microbiology*, 61(5), 1237–1251. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05319.x>
177. Robinson, S. L., Christenson, J. K., & Wackett, L. P. (2019). Biosynthesis and chemical diversity of β -lactone natural products. *Natural product reports*, 36(3), 458–475. <https://doi.org/10.1039/c8np00052b>
178. Rong, X., & Huang, Y. (2012). Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. *Systematic and applied microbiology*, 35(1), 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.10.004>
179. Running, W. (1993). Computer software reviews. Chapman and hall dictionary of natural products on CD-ROM. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 33, 934–935. <https://doi.org/10.1021/ci00016a603>
180. Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
181. Salam, N., Jiao, J. Y., Zhang, X. T., & Li, W. J. (2020). Update on the classification of higher ranks in the phylum Actinobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(2), 1331–1355. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003920>
182. Sánchez-Hidalgo, M., González, I., Díaz-Muñoz, C., Martínez, G., & Genilloud, O. (2018). Comparative Genomics and Biosynthetic Potential Analysis of Two Lichen-Isolated Amycolatopsis Strains. *Frontiers in microbiology*, 9, 369. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00369>
183. Sargin, S. A., Selvi, S., & Büyükcengiz, M. (2015). Ethnomedicinal plants of Aydıncık District of Mersin, Turkey. *Journal of ethnopharmacology*, 174, 200–216. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.008>
184. Sarkar, P., Yarlagadda, V., Ghosh, C., & Haldar, J. (2017). A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics.

<https://doi.org/10.1039/c6md00585c>

185. Saviola, B., Bishai, W. (2006). The Genus *Mycobacterium*-Medical. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_34
186. Sayed, A. M., Abdel-Wahab, N. M., Hassan, H. M., & Abdelmohsen, U. R. (2020). *Saccharopolyspora*: an underexplored source for bioactive natural products. *Journal of applied microbiology*, 128(2), 314–329. <https://doi.org/10.1111/jam.14360>
187. Schatz, A., & Waksman, S.S. (1944). Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and Related Organisms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 57, 244–248 <https://doi.org/10.3181/00379727-57-14>
188. Sedmera, P., Pospíšil, S., & Novák, J. (1991). New Furanonaphthoquinone from *Streptomyces cinnamomensis*. *Journal of Natural Products*, 54(3), 870–872. <https://doi.org/10.1021/np50075a022>
189. Seipke, R. F., & Hutchings, M. I. (2013). The regulation and biosynthesis of antimycins. *Beilstein journal of organic chemistry*, 9, 2556–2563. <https://doi.org/10.3762/bjoc.9.290>
190. 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>
191. Seto, H., Watanabe, H., Furihata, K. (1996). Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aerioouvifer*. *Tetrahedron Letters*, 37, 7979–7982. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)01787-X](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)01787-X)
192. Shen, X., Mustafa, M., Chen, Y., Cao, Y., & Gaoet, J. (2019). Natural thiopeptides as a privileged scaffold for drug discovery and therapeutic

- development. *Medicinal Chemistry Research*, 28(8), 1063–1098.
<https://doi.org/10.1007/s00044-019-02361-1>
193. Sheng, Y., Fotso, S., Serrill, J. D., Shahab, S., Santosa, D. A., Ishmael, J. E., Proteau, P. J., Zabriskie, T. M., & Mahmud, T. (2015). Succinylated apoptolidins from *Amycolatopsis* sp. ICBB 8242. *Organic Letters*, 17(10), 2526–2529. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01055>
194. Shin, B., Kim, B. Y., Cho, E., Oh, K. B., Shin, J., Goodfellow, M., & Oh, D. C. (2016). Actinomadurol, an antibacterial norditerpenoid from a rare actinomycete, *Actinomadura* sp. KC 191. *Journal of natural products*, 79(7), 1886–1890. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00268>
195. Shiomi, K., Nakamura, H., Iinuma, H., Naganawa, H., Isshiki, K., Takeuchi, T., ... & Iitaka, Y. (1986). Structures of new antibiotics napyradiomycins. *The Journal of Antibiotics*, 39(4), 494–501. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.494>
196. Siegl, T., Tokovenko, B., Myronovskyi, M., & Luzhetskyy, A. (2013). Design, construction and characterisation of a synthetic promoter library for fine-tuned gene expression in actinomycetes. *Metabolic engineering*, 19, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.07.006>
197. Silva, L. J., Crevelin, E. J., Souza, D. T., Lacerda-Júnior, G. V., de Oliveira, V. M., Ruiz, A. L. T. G., Rosa, L. H., Moraes, L. A. B., & Melo, I. S. (2020). Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer discovery. *Scientific reports*, 10(1), 13870. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69786-2>
198. 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>
199. Skinnider, M. A., Johnston, C. W., Gunabalasingam, M., Merwin, N. J., Kieliszek, A. M., MacLellan, R. J., Li, H., Ranieri, M. R. M., Webster, A. L. H., Cao, M. P. T., Pfeifle, A., Spencer, N., To, Q. H., Wallace, D. P., Dejong, C. A., & Magarvey, N. A. (2020). Comprehensive prediction of secondary metabolite

- structure and biological activity from microbial genome sequences. *Nature communications*, 11(1), 6058. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19986-1>
200. 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>
201. Song, Z., Xu, T., Wang, J., Hou, Y., Liu, C., Liu, S., & Wu, S. (2021). Secondary metabolites of the genus *Amycolatopsis*: Structures, bioactivities and biosynthesis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(7), 1884. <https://doi.org/10.3390/molecules26071884>
202. 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>
203. 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
204. Stephan, H., Kempter, C., Metzger, J. W., Jung, G., Potterat, O., Pfefferle, C., & Fiedler, H. P. (1996). Kanchanamycins, new polyol macrolide antibiotics produced by *Streptomyces olivaceus* Tii 4018. II. Structure elucidation. *The Journal of antibiotics*, 49(8), 765–769. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.765>
205. Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 67(4), 491–502. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>

206. Su, L., Jia, W., Hou, C., & Lei, Y. (2011). Microbial biosensors: a review. *Biosensors & bioelectronics*, 26(5), 1788–1799. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.005>
207. Subramani, R., & Sipkema, D. (2019). Marine rare actinomycetes: A promising source of structurally diverse and unique novel natural products. *Marine drugs*, 17(5), 249. <https://doi.org/10.3390/md17050249>
208. Sujatha, S., & Praharaj, I. (2012). Glycopeptide resistance in gram-positive cocci: a review. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2012, 781679. <https://doi.org/10.1155/2012/781679>
209. Sun, Y., Zhou, X., Liu, J., Bao, K., Zhang, G., Tu, G., Kieser, T., & Deng, Z. (2002). '*Streptomyces nanchangensis*', a producer of the insecticidal polyether antibiotic nanchangmycin and the antiparasitic macrolide meilingmycin, contains multiple polyketide gene clusters. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 2), 361–371. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-361>
210. Takahashi, K., Fukushi, E., Kawabata, J., Matsuura, H., Kurosawa, K. (2013). Ushikulide C, a new immunosuppressant from *Streptomyces* sp. IUK-102. *Natural Product Communications*, 8(6), 815-816. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800634>
211. Takahashi, Y., & Nakashima, T. (2018). Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 7(2), 45. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020045>
212. Tang, X., Li, J., Millán-Aguiñaga, N., Zhang, J. J., O'Neill, E. C., Ugalde, J. A., Jensen, P. R., Mantovani, S. M., & Moore, B. S. (2015). Identification of thiotetronic acid antibiotic biosynthetic pathways by target-directed genome mining. *ACS chemical biology*, 10(12), 2841–2849. <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00658>
213. Taurino, C., Frattini, L., Marcone, G., Gastaldo, L., & Marinelli, F. (2011). *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121 as a cell factory for producing teicoplanin. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 82. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-82>

214. Terra, L., Dyson, P. J., Hitchings, M. D., Thomas, L., Abdelhameed, A., Banat, I. M., Gazze, S. A., Vujaklija, D., Facey, P. D., Francis, L. W., & Quinn, G. A. (2018). A novel alkaliphilic *Streptomyces* inhibits ESKAPE pathogens. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02458>
215. Tian, J., Yang, J., Li, L., Ruan, L., Wei, W., Zheng, G., Zhao, W., Chen, J., Jiang, W., Ge, M., & Lu, Y. (2015). The complete genome sequence of a high pristinamycin-producing strain *Streptomyces pristinaespiralis* HCCB10218. *Journal of biotechnology*, *214*, 45–46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.09.010>
216. Tian, L., Shi, S., Zhang, X., Han, F., & Dong, H. (2023). Newest perspectives of glycopeptide antibiotics: biosynthetic cascades, novel derivatives, and new appealing antimicrobial applications. *World journal of microbiology & biotechnology*, *39*(2), 67. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03512-0>
217. Tistechok, S., Myronovskiy, M., Fedorenko, V., Luzhetskyy, A., & Gromyko, O. (2022). Screening of thiopeptide-producing streptomycetes isolated from the rhizosphere soil of *Juniperus excelsa*. *Current microbiology*, *79*(10), 305. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03004-2>
218. Tistechok, S., Roman, I., Fedorenko, V., Luzhetskyy, A., Gromyko, O. (2023) Diversity and bioactive potential of *Actinomycetia* from the rhizosphere soil of *Juniperus excelsa*. *Folia Microbiologica*, *68*(4), 645–653. <https://doi.org/10.1007/s12223-023-01047-x>
219. Tistechok, S., Stierhof, M., Kachor, A., Myronovskiy, M., Gromyko, O., & Luzhetskyy, A. (2022). Flavacol and its novel derivative 3- β -hydroxy flavacol from *Streptomyces* sp. Pv 4-95 after the expression of heterologous AdpA. *Microorganisms*, *10*(12), 2335. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122335>
220. Tistechok, S., Stierhof, M., Myronovskiy, M., Zapp, J., Gromyko, O., Luzhetskyy, A. (2022) Furaquinocins K and L: Novel naphthoquinone-based meroterpenoids from *Streptomyces* sp. Je 1-369. *Antibiotics (Basel)*, *11*(11), 1587. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111587>

221. Tistechok, S.I., Tymchuk, I.V., Korniychuk, O.P., Fedorenko, V.O., Luzhetskyy, A.M., Gromyko, O.M. (2021). Genetic identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. strain Je 1–6 isolated from rhizosphere soil of *Juniperus excelsa* Bieb. *Cytology and Genetics*, 55, 28–35. <https://doi.org/10.3103/S0095452721010138>
222. Tiwari, K., & Gupta, R. K. (2012). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical reviews in biotechnology*, 32(2), 108–132. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.562482>
223. Torres-Rodriguez, J. A., Reyes-Pérez, J. J., Quiñones-Aguilar, E. E., & Hernandez-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>
224. 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>
225. Tseng, M., Su, Y. S., Cheng, M. J., Liu, T. W., Chen, I. S., Wu, M. D., Chang, H. S., & Yuan, G. F. (2013). Chemical constituents from a soil-derived actinomycete, *Actinomadura miaoliensis* BCRC 16873, and their inhibitory activities on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production. *Chemistry & biodiversity*, 10(2), 303–312. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200242>
226. Tzung, S. P., Kim, K. M., Basañez, G., Giedt, C. D., Simon, J., Zimmerberg, J., Zhang, K. Y., & Hockenbery, D. M. (2001). Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nature cell biology*, 3(2), 183–191. <https://doi.org/10.1038/35055095>
227. Uri, J., Bogнар, R., Bekesi, I., & Varga, B. (1958). Desertomycin, a new crystalline antibiotic with antibacterial and cytostatic action. *Nature*, 182(4632), 401. <https://doi.org/10.1038/182401a0>

228. van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., & van Wezel, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS microbiology reviews*, *41*(3), 392–416. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux005>
229. van Wezel, G. P., & McDowall, K. J. (2011). The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Natural product reports*, *28*(7), 1311–1333. <https://doi.org/10.1039/c1np00003a>
230. 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.
231. Vinogradov, A. A., & Suga, H. (2020). Introduction to thiopeptides: Biological activity, biosynthesis, and strategies for functional reprogramming. *Cell chemical biology*, *27*(8), 1032–1051. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.07.003>
232. Waksman, S. A., & Woodruff, H. B. (1942). Selective antibiotic action of various substances of microbial origin. *Journal of bacteriology*, *44*(3), 373–384. <https://doi.org/10.1128/jb.44.3.373-384.1942>
233. Waksman, S.A., & Woodruff, H.B. (1940). Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomyces. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *45*, 609–614.
234. Wang, W., Park, K. H., Lee, J., Oh, E., Park, C., Kang, E., Lee, J., & Kang, H. (2020). A new thiopeptide antibiotic, micrococcin P3, from a marine-derived strain of the bacterium *Bacillus stratosphericus*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(19), 4383. <https://doi.org/10.3390/molecules25194383>
235. Weinstein, M. J., Luedemann, G. M., Oden, E. M., Wagman, G. H., Rosselet, J. P., Marquez, J. A., Coniglio, C. T., Charney, W., Herzog, H. L., & Black, J. (1963). Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora*. *Journal of medicinal chemistry*, *6*, 463–464. <https://doi.org/10.1021/jm00340a034>
236. Weinstein, M. J., Wagman, G. H., Marquez, J. A., Testa, R. T., Oden, E., & Waitz, J. A. (1969). Megalomicin, a new macrolide antibiotic complex produced

- by *Micromonospora*. *The Journal of antibiotics*, 22(6), 253–258.
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.22.253>
237. Winter, J. M., Behnken, S., & Hertweck, C. (2011). Genomics-inspired discovery of natural products. *Current opinion in chemical biology*, 15(1), 22–31.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.020>
238. Xu, D., Nepal, K. K., Chen, J., Harmody, D., Zhu, H., McCarthy, P. J., Wright, A. E., & Wang, G. (2018). Nocardiopeptidins A-C: New angucyclines with anti-MRSA activity isolated from a marine sponge-derived *Nocardiopeptidum* sp. HB-J378. *Synthetic and systems biotechnology*, 3(4), 246–251.
<https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.10.008>
239. Xu, J., Zhang, J., Zhuo, J., Li, Y., Tian, Y., & Tan, H. (2017). Activation and mechanism of a cryptic oviedomycin gene cluster via the disruption of a global regulatory gene, *adpA*, in *Streptomyces ansochromogenes*. *The Journal of biological chemistry*, 292(48), 19708–19720.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.809145>
240. 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>
241. Yushchuk, O., Ostash, I., Mösker, E., Vlasiuk, I., Deneka, M., Rückert, C., Busche, T., Fedorenko, V., Kalinowski, J., Süßmuth, R. D., & Ostash, B. (2021). Eliciting the silent lucensomycin biosynthetic pathway in *Streptomyces cyanogenus* S136 via manipulation of the global regulatory gene *adpA*. *Scientific reports*, 11(1), 3507. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82934-6>
242. Zerikly, M., & Challis, G. L. (2009). Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 10(4), 625–633. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800389>
243. 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>
244. Zhao, M., Tang, Y., Xie, J., Zhao, Z., & Cui, H. (2021). Meroterpenoids produced by fungi: Occurrence, structural diversity, biological activities, and their molecular targets. *European journal of medicinal chemistry*, 209, 112860.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112860>
245. Андреюк, Е.И., Владимірова, С.Б., & Коган, Е.В. (1974). Актиномицети почв юга европейской части СССР и их биологическая активность. Вид-во "Наук. думка", Київ, 143 с.
246. Бабко А., Тістечок С., Федоренко В., Громико О. (2018, 9–11 квітня). Вплив плеiotропного транскрипційного регулятора Adra на антибіотичну активність штамів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 16-17.
247. Громико О.М., Тістечок С.І., Федоренко В.О. Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. ІМВ Ас-5039 - продуцент тіопептидного антибіотика бернінаміцину А : Пат. 122104 Україна : МПК (2020.01) С12N 1/20 (2006.01) С12R 1/465 (2006/01) А61К 31/00. № а 201903180; заявл. 01.04.2019; опубл. 10.09.2020, Бюл. № 17.
248. Громико, О. (2010). Фунгіцидна й антибактерійна активність актиноміцетів, виділених із ризосфери ялівця високого *Juniperus excelsa* Vieb. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 53, 156–160.
249. Мушинська В., Тістечок С., Мицик Ю., Лужецький А., Федоренко В., Громико О. (2018, 9–11 квітня). Скринінг продуцентів памаміцинів серед актиноміцетних штамів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 24.
250. Рибчук А., Тістечок С., Федоренко В., Громико О. (2023, 26–28 квітня) Характеристика актиноміцетів родини Pseudonocardiaceae з ризосфери рослин кримського півострова. Збірник тез XIX Міжнародної наукової

- конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 96-97.
251. Тістечок С., Конечний Ю., Тимчук І., Панас М., Корнійчук О., Федоренко В., Громико О. (2018, 10–12 квітня). Актиноміцети ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. – продуценти антимікотичних сполук. Збірник тез XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 150-151.
252. Тістечок С., Корнійчук О., Тимчук І., Громико О., Федоренко В. (2018, 16–20 квітня). Антибіотична активність актиноміцетів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. – антагоністів MRSA. Третій щорічний регіональний науковий симпозіум в рамках концепції „Єдине здоров'я”, Київ, 135.
253. Тістечок С., Мищик Ю., Тимчук І., Конечний Ю., Качор А. (2018, 28–30 листопада). Метаболічний профіль та антибактеріальна активність штаму *Streptomyces* sp. Lv 1-120. Збірник тез XIII міжнародної конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери” Харків, Україна, 122-123.
254. Тістечок С., Федоренко В., Лужецький А., Громико О. (2021, 19–21 квітня). Аналіз послідовності чернетки генома штаму *Streptomyces* sp. Je 1-369. Збірник тез XVII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 116-117.
255. Тістечок С.І., Мироновський М. Л., Федоренко В. О., Лужецький А. М., Громико О.М. (2022, 25 серпня). Скринінг продуцентів тіопептидних антибіотиків з використанням репортерної системи на основі промотора гена *tipA*. XXII міжнародна Гамовська конференція “The importance of G. Gamow’s ideas for biology of the 21st century”, Одеса, Україна, 115-116.
256. Тістечок С.І., Громико О.М., Федоренко В.О. Спосіб уведення реплікативних та інтегративних плазмід у штам *Streptomyces* sp. Lv 1-48 – продуцент антибіотика юніпероліду А : Пат. 128141 Україна: МПК (2018.01) C12N 15/00 C12P 23/00. № u 201801407; заявл. 13.02.2018; опубл. 10.09.2018, Бюл. № 17.

257. Тістечок С.І., Громико О.М., Федоренко В.О. Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. ІМВ Ас-5038 – продуцент антибіотика лідикаміцину та його похідних : Пат. 123122 Україна : МПК С12N 1/20 (2006.01) С12R 1/465 (2006.1) G01N 33/569 (2006.01) С12P 17/18 (2006.01). № а 2019 08169; заявл. 15.07.2019; опубл. 17.02.2021, Бюл. №7.
258. Тістечок С.І., Ребець Ю.В., Федоренко В.О., Лужецький А.М., Громико О.М. (2023, 11–13 травня) Гетерологічна експресія кластеру генів нового природного антибіотика Je478 у штаммах стрептоміцетів. Збірник тез VII міжнародної науково-практичної конференції “Тернопільські біологічні читання – Ternopil bioscience – 2023”, Тернопіль, Україна, 165-168.
259. Тістечок, С., Федоренко, В., Громико, О. (2023) Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. Je 1-93, продуцент антифунгальних антибіотиків. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 88, 17–25. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2023.88.02>
260. Тістечок, С.І., Дацюк, Ю.Р., Федоренко, В.О., Громико, О.М. (2020). Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. Je 1-42: філогенетичний аналіз, біологічні властивості та спектр вторинних метаболітів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 27, 276–281. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v27.1338>
261. Тістечок, С.І., Сирватка, В.Я., Федоренко, В.О., & Громико, О.М. (2018) Актиноміцети ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. – антагоністи фітопатогенної мікробіоти. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 23, 340-345. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1038>
262. Федоренко, В. О., Осташ, Б. О., Гончар, М. В., & Ребець, Ю. В. (2007). Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Львів: Видавничий центр ЛНУ.
263. <https://redbook-ua.org/item/juniperus-excelsa-mbieb/>.
264. <https://lpsn.dsmz.de/genus/streptomyces>
265. <https://lpsn.dsmz.de/genus/Promicromonospora>

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

Наукові статті

1. Тістечок, С.І., Сирватка, В.Я., Федоренко, В.О., Громико, О.М. (2018). Актиноміцети ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. – антагоністи фітопатогенної мікробіоти. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 23, 340–345. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1038> (Фахове видання України, категорія Б) (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
2. Rebets, Y., Schmelz, S., Gromyko, O., Tistechok, S., Petzke, L., Scrima, A., Luzhetskyu, A. (2018). Design, development and application of whole-cell based antibiotic-specific biosensor. *Metabolic engineering*, 47, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.019> (Scopus, Web of Science, Q1) (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень щодо тестування створеного біосенсору)
3. Тістечок, С.І., Дацюк, Ю.Р., Федоренко, В.О., Громико, О.М. (2020). Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. Je 1-42: філогенетичний аналіз, біологічні властивості та спектр вторинних метаболітів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 27, 276–281. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v27.1338> (Фахове видання України, категорія Б) (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
4. Tistechok, S.I., Tymchuk, I.V., Korniyuchuk, O.P., Fedorenko, V.O., Luzhetskyu, A.M., Gromyko, O.M. (2021). Genetic identification and antimicrobial activity of

- Streptomyces* sp. strain Je 1–6 isolated from rhizosphere soil of *Juniperus excelsa* Bieb. *Cytology and Genetics*, 55, 28–35. <https://doi.org/10.3103/S0095452721010138> (Scopus, Фахове видання України, категорія А) (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
5. **Tistechok, S.**, Myronovskyi, M., Fedorenko, V., Luzhetskyu, A. Gromyko O. (2022). Screening of thiopeptide-producing streptomycetes isolated from the rhizosphere soil of *Juniperus excelsa*. *Current Microbiology*, 79(10), 305. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03004-2> (Scopus, Web of Science, Q2) (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
6. **Tistechok, S.**, Stierhof, M., Myronovskyi, M., Zapp, J., Gromyko, O., Luzhetskyu, A. (2022) Furaquinocins K and L: Novel naphthoquinone-based meroterpenoids from *Streptomyces* sp. Je 1-369. *Antibiotics (Basel)*, 11(11), 1587. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111587> (Scopus, Web of Science, Q1) (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
7. **Тістечок, С.**, Федоренко, В., Громико, О. (2023) Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. Je 1-93, продуцент антифунгальних антибіотиків. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 88, 17–25. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2023.88.02> (Фахове видання України, категорія Б) (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
8. **Tistechok, S.**, Roman, I., Fedorenko, V. Luzhetskyu, A., Gromyko, O. (2023) Diversity and bioactive potential of *Actinomycetia* from the rhizosphere soil of *Juniperus excelsa*. *Folia Microbiologica*, 68(4), 645–653.

<https://doi.org/10.1007/s12223-023-01047-x> (Scopus, Web of Science, Q3)
(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)

Патенти України

1. Громико О.М., Тістечок С.І., Федоренко В.О. Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. ІМВ Ас-5039 - продуцент тіопептидного антибіотика бернінаміцину А : Пат. 122104 Україна : МПК (2020.01) С12N 1/20 (2006.01) С12R 1/465 (2006/01) А61К 31/00. № а 201903180; заявл. 01.04.2019; опубл. 10.09.2020, Бюл. № 17.
2. Тістечок С.І., Громико О.М., Федоренко В.О. Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. ІМВ Ас-5038 – продуцент антибіотика лідикаміцину та його похідних : Пат. 123122 Україна : МПК С12N 1/20 (2006.01) С12R 1/465 (2006.1) G01N 33/569 (2006.01) С12P 17/18 (2006.01). № а 2019 08169; заявл. 15.07.2019; опубл. 17.02.2021, Бюл. №7.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Тістечок С., Конечний Ю., Тимчук І., Панас М., Корнійчук О., Федоренко В., Громико О. (2018, 10–12 квітня). Актиноміцети ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. – продуценти антимікотичних сполук. Збірник тез XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 150-151. (Очна участь, усна доповідь).
2. Тістечок С., Корнійчук О., Тимчук І., Громико О., Федоренко В. (2018, 16–20 квітня). Антибіотична активність актиноміцетів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. – антагоністів MRSA. Третій щорічний регіональний науковий симпозіум в рамках концепції „Єдине здоров’я”, Київ, 135. (Очна участь, усна доповідь).
3. Тістечок С., Мицик Ю., Тимчук І., Конечний Ю., Качор А. (2018, 28–30 листопада). Метаболічний профіль та антибактеріальна активність штаму

- Streptomyces* sp. Lv 1-120. Збірник тез XIII міжнародної конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери” Харків, Україна, 122-123. (Очна участь, усна доповідь).
4. Бабко А., **Тістечок С.**, Федоренко В., Громико О. (2018, 9–11 квітня). Вплив плейотропного транскрипційного регулятора Adra на антибіотичну активність штамів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 16-17. (Заочна участь).
 5. Мушинська В., **Тістечок С.**, Мицик Ю., Лужецький А., Федоренко В., Громико О. (2018, 9–11 квітня). Скринінг продуцентів памаміцинів серед актиноміцетних штамів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 24. (Заочна участь).
 6. **Тістечок С.**, Федоренко В., Лужецький А., Громико О. (2021, 19–21 квітня). Аналіз послідовності чернетки генома штаму *Streptomyces* sp. Je 1-369. Збірник тез XVII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 116-117. (Заочна участь).
 7. **Тістечок С.І.**, Мироновський М. Л., Федоренко В. О., Лужецький А. М., Громико О.М. (2022, 25 серпня). Скринінг продуцентів тіопептидних антибіотиків з використанням репортерної системи на основі промотора гена *tipA*. XXII міжнародна Гамовська конференція “The importance of G. Gamow’s ideas for biology of the 21st century”, Одеса, Україна, 115-116. (Дистанційна участь, усна доповідь).
 8. Рибчук А., **Тістечок С.**, Федоренко В., Громико О. (2023, 26–28 квітня) Характеристика актиноміцетів родини Pseudonocardiaceae з ризосфери рослин кримського півострова. Збірник тез XIX Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ в біології”, Львів, Україна, 96-97. (Заочна участь).
 9. **Тістечок С.І.**, Ребець Ю.В., Федоренко В.О., Лужецький А.М., Громико О.М. (2023, 11–13 травня) Гетерологічна експресія кластеру генів нового

природного антибіотика Je478 у штаммах стрептоміцетів. Збірник тез VII міжнародної науково-практичної конференції “Тернопільські біологічні читання – Ternopil bioscience – 2023”, Тернопіль, Україна, 165-168. *(Дистанційна участь, усна доповідь).*

Додаток Б

ШТАМИ МІКРООРГАНІЗМІВ ВИКОРИСТАНІ В РОБОТІ

Таблиця Б.1

Список ізолятів актиноміцетій виділених з ризосфери *J. excelsa*, їхні депозитарні номери в базі даних GeneBank, антимікробні активності та скринінг з використанням біосенсорів

Ізолят	Рід	GeneBank ID	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 31324	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 29905	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	<i>Pseudomonas syringae</i> IMB 8511	<i>P. fluorescens</i> IMB 8573	<i>P. savastanoi</i> <i>pv. phaseolicola</i> IMB 4012	<i>Pectobacterium carotovorum</i> IMB 8982	<i>Xantomonas campestris</i> <i>pv. campestris</i> IMB8003	<i>Agrobacterium tumifaciens</i> IMB 8628	<i>Erwinia amylovora</i> Mi2	<i>Alternaria alternata</i> DSM 1102	<i>Fusarium oxysporum</i> IMB 54201	<i>Botrytis cinerea</i> IMB 2306	<i>Aspergillus niger</i> IMB 16706	<i>S. lividans</i> TK24 pMO16	<i>B. subtilis</i> HB0950	<i>S. albus</i> ΔpseB4 CD10RO1
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Je 1-1	Streptomyces	OP720312	1,6	1,7	0	0	0	0	2,4	0	0	1,8	0	4,7	0	2,7	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-2	Streptomyces	OP720313	1,7	1,2	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	1,6	0	3,4	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-3	Streptomyces	OP720314	4,7	4,2	0	0	0	0	2,5	0	0	3,6	0	2,6	0	3,2	1,4	1,5	1,3	0	-	-	-
Je 1-4	Streptomyces	OP720315	0	0	1,4	0	0	0	2,5	0	0	1,3	1,2	0	0	0	1,8	1,3	1,3	0	-	-	-
Je 1-5	Streptomyces	OP720316	1,3	0	1,1	0	0	0	0	0	0	1,2	0	0	0	0	0	0	2,0	0	-	-	-
Je 1-6	Streptomyces	MT247673	2,7	1,3	1,7	0	0	0	0	0	0	0	1,4	0	0	3,0	0	0	0	0	-	+	-
Je 1-7	Streptomyces	OP720317	5,3	3,7	0	0	0	0	0	0	0	3,4	0	3,0	0	3,6	0	0	0	0	-	+	-
Je 1-8	Streptomyces	OP720318	1,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	2,5	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-9	Streptomyces	OP720319	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-10	Streptomyces	OP720320	4,2	1,6	0	0	0	0	0	0	0	7,0	6,0	4,8	0	3,8	1,3	0	1,3	0	-	+	-
Je 1-12	Streptomyces	OP720321	4,3	2,8	0	0	0	0	0	0	0	4,0	0	2,9	0	3,2	1,8	2,0	1,8	0	-	+	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Je 1-13	Streptomyces	OP720322	3,4	2,8	0	0	0	0	0	0	0	4,2	0	2,8	0	3,2	1,5	2,0	0	0	-	-	-
Je 1-14	Streptomyces	OP720323	1,6	1,6	0	0	0	0	3,4	0	0	1,5	0	4,9	0	4,7	0	0	0	0	-	+	-
Je 1-15	Streptomyces	OP720324	2,0	1,4	0	0	0	0	0	0	0	2,0	0	2,5	0	1,7	0	0	0	0	-	+	-
Je 1-16	Streptomyces	OP720325	2,1	2,1	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0	1,4	0	1,6	0	0	0	0	-	+	-
Je 1-17	Streptomyces	OP720326	1,8	1,6	0	0	0	0	3,0	0	0	1,4	0	1,6	0	2,7	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-18	Streptomyces	OP720327	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-19	Streptomyces	OP720328	2,9	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	0	1,1	0	1,6	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-21	Streptomyces	JX232287	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-21.1	Streptomyces	OP720329	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-22	Streptomyces	OP720330	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-22.2	Streptomyces	OP720331	0	0	0	0	0	0	2,5	0	0	0	0	1,7	0	0	4,4	1,9	1,7	1,3	-	-	-
Je 1-24	Streptomyces	OP720332	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-25	Streptomyces	OP720333	0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-26	Streptomyces	OP720334	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	0	0	1,5	1,8	1,4	0	-	-	-
Je 1-29	Streptomyces	OP720335	1,4	0	0	0	0	0	2,0	0	0	1,7	0	1,9	3,1	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-30	Streptomyces	OP720336	1,7	1,7	0	0	0	0	2,0	0	0	1,5	0	2,1	0	2,8	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-34	Streptomyces	OP720337	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6	0	1,7	0	4,2	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-35	Streptomyces	OP720338	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-36	Streptomyces	OP720339	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-37	Streptomyces	OP720340	2,2	2,0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	1,2	0	1,4	1,3	1,1	1,3	0	-	-	-
Je 1-38	Streptomyces	OP720341	1,5	1,3	1,4	0	0	0	2,8	0	0	1,1	0	0	0	1,3	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-39	Streptomyces	OP720342	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-40	Streptomyces	OP720343	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-41	Streptomyces	OP720344	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,8	0	-	-	-
Je 1-42	Streptomyces	OP720345	1,9	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	1,8	1,5	1,7	1,5	1,4	3,4	0	-	-	-
Je 1-43	Streptomyces	OP720346	5,4	0	0	0	0	0	0	0	0	4,6	3,6	4,5	0	4,0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-44	Streptomyces	OP720347	1,8	0	0	0	0	0	1,2	0	0	0	0	1,7	0	1,6	1,2	1,2	4,2	0	-	-	-
Je 1-47	Streptomyces	OP720348	1,6	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7	0	1,8	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-48	Streptomyces	[169]	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	1,3	1,9	1,3	1,2	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-49	Streptomyces	OP720349	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	1,3	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-50	Streptomyces	OP720350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Je 1-53	Streptomyces	OP720351	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-55	Streptomyces	OP720352	3,3	2,9	0	1,5	0	1,7	1,3	0	0	3,1	0	0	1,9	2,8	0	0	0	0	0	-	+	-
Je 1-56	Streptomyces	OP720353	1,3	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-57	Streptomyces	OP720354	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-58	Streptomyces	OP720355	5,7	1,6	0	0	0	0	0	0	0	5,2	4,5	3,2	0	4,8	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-62	Streptomyces	OP720356	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-64	Streptomyces	OP720357	1,7	1,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,4	0	1,6	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-65	Streptomyces	OP720358	1,1	0	0	0	0	0	0	1,2	0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-66	Streptomyces	OP720359	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-68	Streptomyces	OP720360	1,6	1,6	0	0	0	0	1,4	0	0	0	0	1,3	0	1,2	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-69	Streptomyces	OP720361	2,5	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-70	Streptomyces	OP720362	1,6	1,4	0	0	0	0	0	0	0	1,3	0	1,4	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-71	Streptomyces	OP720363	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-72	Streptomyces	OP720364	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-73	Streptomyces	OP720365	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-76	Streptomyces	OP720366	3,5	4,0	0	0	0	0	2,5	0	0	3,0	0	3,9	0	3,6	2,0	2,3	1,9	1,2	-	+	-	-
Je 1-77	Streptomyces	OP720367	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-78	Streptomyces	OP720368	1,2	0	0	0	0	0	1,4	0	0	0	0	1,7	0	1,2	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-79	Streptomyces	OL636373	2,8	3,2	2,5	4,3	3,1	2,7	0	2,0	0	4,3	5,8	2,4	2,8	3,4	0	0	0	0	0	+	+	-
Je 1-80	Streptomyces	OP720369	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-81	Streptomyces	OP720370	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-82	Streptomyces	OP720371	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0	2,0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-83	Streptomyces	OP720372	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-84	Streptomyces	OP720373	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-85	Streptomyces	OP720374	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-86	Streptomyces	OP720375	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-87	Streptomyces	OP720376	1,2	0	0	0	0	0	1,2	0	0	0	0	1,5	1,1	1,1	1,5	1,5	0	0	0	-	-	-
Je 1-87.1	Streptomyces	OP720377	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-88	Streptomyces	OP720378	4,3	3,7	0	0	0	0	0	0	0	3,6	0	2,6	0	4,4	1,4	1,8	0	0	0	-	+	-
Je 1-89	Streptomyces	OP720379	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	2,7	0	0	0	2,1	0	0	1,5	3,0	-	+	-	-
Je 1-90	Streptomyces	OP720380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
Je 1-91	Streptomyces	OP720381	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
Je 1-92	Streptomyces	OP720382	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-93	Streptomyces	OP389125	0	0	0	0	0	0	2,0	0	0	0	0	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-94	Streptomyces	OP720383	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,1	1,2	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-95	Streptomyces	OP720384	0	0	0	0	0	0	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-96	Streptomyces	OP720385	0	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0	0	1,4	0	1,7	0	0	0	-	-	-
Je 1-97	Streptomyces	OP720386	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-98	Streptomyces	OP720387	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-99	Streptomyces	OP720388	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-100	Streptomyces	OP720389	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,6	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-101	Streptomyces	OP720390	3,1	4,3	0	0	0	0	0	0	0	3,8	0	2,6	0	5,0	0	0	0	0	0	0	-	+	-
Je 1-102	Streptomyces	OP720391	1,4	1,3	0	0	0	0	0	0	0	1,6	0	1,4	0	2,9	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-103	Streptomyces	OP720392	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-104	Streptomyces	OP720393	2,3	1,3	0	0	0	0	0	0	0	2,0	0	2,2	0	4,0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-105	Streptomyces	OP720394	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6	0	0	0	-	-	-
Je 1-106	Promicromonospora	OP720395	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-107	Streptomyces	OP720396	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-108	Streptomyces	OP720397	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,2	0	0	0	-	-	-
Je 1-111	Streptomyces	OP720398	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-113	Streptomyces	OP720399	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-114	Streptomyces	OP720400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-115	Streptomyces	OP720401	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-116	Streptomyces	OP720402	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-117	Streptomyces	OP720403	1,8	1,8	0	0	0	0	4,3	0	0	1,3	0	8,0	0	5,7	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-118	Streptomyces	OP720404	1,8	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	0	1,4	1,3	0	0	0	0	-	-	+
Je 1-120	Streptomyces	OP720405	2,0	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	0	0	0	0	-	+	-
Je 1-135	Nocardia	OP720406	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-140	Streptomyces	OP720407	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-141	Streptomyces	OP720408	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-143	Streptomyces	OP720409	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,8	0	0	0	-	-	+
Je 1-144	Streptomyces	OP720410	1,5	1,6	0	0	0	0	2,1	0	0	2,2	0	0	1,4	1,8	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	-	-	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Je 1-145	Streptomyces	OP720411	3,3	1,6	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	1,7	0	2,3	0	0	0	0	-	-	-	
Je 1-146	Streptomyces	OP720412	0	0	0	0	0	0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	1,2	1,2	1,2	1,2	-	-	-	
Je 1-148	Promicromonospora	OP720413	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-149	Streptomyces	OP720414	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-150	Streptomyces	OP720415	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-154	Streptomyces	OP720416	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-155	Streptomyces	OP720417	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-156	Streptomyces	OP720418	0	0	0	0	0	2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-157	Streptomyces	OP720419	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-158	Streptomyces	OP720420	0	0	0	0	0	4,2	0	0	0	0	0	1,8	1,7	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-159	Streptomyces	OP720421	1,2	0	0	0	0	0	1,3	0	0	1,4	0	2,4	0	1,6	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	-	-	-
Je 1-160	Streptomyces	OP720422	1,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,4	2,2	1,4	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-163	Streptomyces	OP720423	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-164	Streptomyces	OP720424	3,5	1,9	1,6	0	0	0	0	0	0	2,8	0	1,3	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-165	Streptomyces	OP720425	3,6	0	0	0	0	0	0	0	0	2,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-167	Streptomyces	OP720426	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-168	Streptomyces	OP720427	5,4	0	1,3	0	0	0	0	0	0	2,6	0	2,0	1,7	3,3	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-170	Streptomyces	OP720428	3,8	0	0	0	0	0	0	0	0	2,9	0	2,6	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-171	Streptomyces	OP720429	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-172	Streptomyces	OP720430	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-174	Streptomyces	OP720431	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-176	Streptomyces	OP720432	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-177	Streptomyces	OP720433	0	1,5	0	0	0	0	3,2	2,2	2,8	1,8	0	1,6	0	3,0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-182	Streptomyces	OP720434	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3	0	2,0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-184	Streptomyces	OP720435	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-185	Streptomyces	OP720436	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-186	Streptomyces	OP720437	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-188	Streptomyces	OP720438	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-190	Streptomyces	OP720439	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-191	Streptomyces	OP720440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6	0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-195	Streptomyces	OP720441	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Je 1-199	Streptomyces	OP720442	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-200	Streptomyces	OP720443	4,2	2,7	4,0	0	10,0	6,8	0	2,5	2,0	2,3	3,3	4,8	2,2	4,0	2,5	2,8	2,2	0	-	+	-	
Je 1-204	Streptomyces	OP720444	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-206	Streptomyces	OP720445	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,8	2,8	1,8	3,3	3,0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-207	Streptomyces	OP720446	1,9	1,4	1,9	0	1,5	0	0	0	0	1,5	1,4	2,8	0	1,7	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-208	Streptomyces	OP720447	0	0	0	0	4,0	3,8	0	0	0	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-209	Streptomyces	OP720448	2,3	1,4	1,9	0	1,3	1,4	0	0	0	1,3	0	2,0	0	1,4	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-212	Streptomyces	OP720449	0	0	0	0	3,0	2,7	1,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-213	Streptomyces	OP720450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	-	-	-
Je 1-214	Streptomyces	OP720451	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-216	Streptomyces	OP720452	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-218	Streptomyces	OP720453	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-220	Streptomyces	OP720454	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-221	Streptomyces	OP720455	1,4	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-224	Streptomyces	OP720456	5,0	3,1	0	0	0	0	0	0	0	3,2	0	6,4	0	6,3	0	0	0	0	0	-	+	+
Je 1-225	Streptomyces	OP720457	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-227	Streptomyces	OP720458	2,6	1,5	0	0	0	0	2,1	0	0	3,0	0	2,3	0	1,4	1,4	1,2	0	0	0	-	-	-
Je 1-230	Streptomyces	OP720459	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,1	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-233	Streptomyces	OP720460	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,1	0	0	-	-	-
Je 1-234	Streptomyces	OP720461	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-237	Streptomyces	OP720462	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-239	Streptomyces	OP720463	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-240	Streptomyces	OP720464	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-241	Streptomyces	OP720465	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-242	Streptomyces	OP720466	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0	1,2	1,5	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-244	Streptomyces	OP720467	5,5	0	0	0	0	0	0	0	0	6,4	4,4	5,0	0	4,6	0	0	0	0	0	-	+	+
Je 1-245	Streptomyces	OP720468	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-246	Streptomyces	OP720469	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-249	Streptomyces	OP720470	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-253	Streptomyces	OP720471	2,6	2,2	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	2,0	0	2,1	0	0	3,0	3,6	-	-	+	
Je 1-256	Streptomyces	OP720472	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,2	0	-	-	-	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Je 1-258	Streptomyces	OP720473	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-259	Streptomyces	OP720474	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-260	Streptomyces	OP720475	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0	1,1	1,2	0	-	-	-
Je 1-262	Streptomyces	OP720476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-263	Streptomyces	OP720477	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0	-	-	-
Je 1-264	Streptomyces	OP720478	2,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-265	Streptomyces	OP720479	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-266	Streptomyces	OP720480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	0	0	2,4	5,2	0	-	-	-
Je 1-268	Streptomyces	OP720481	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-269	Streptomyces	OP720482	5,0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,2	4,5	4,2	0	4,0	0	0	0	0	0	-	+	-
Je 1-270	Streptomyces	OP720483	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-272	Streptomyces	OP720484	2,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-273	Streptomyces	OP720485	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-275	Streptomyces	OP720486	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-277.2	Streptomyces	OP720487	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6	0	-	-	-
Je 1-277.6	Streptomyces	OP720488	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-277.7	Streptomyces	OP720489	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-278	Streptomyces	OP720490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-280	Streptomyces	OP720491	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6	0	0	-	-	-
Je 1-283	Streptomyces	OP720492	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0	2,8	0	2,5	1,5	3,1	0	0	0	1,5	0	-	-	-
Je 1-284	Streptomyces	OP720493	3,6	2,5	0	0	0	0	0	0	0	2,9	0	5,6	0	3,0	2,9	1,6	2,5	1,6	0	-	+	+
Je 1-285	Streptomyces	OP720494	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,2	1,7	1,2	0	0	0	2,4	0	0	-	-	-
Je 1-286	Streptomyces	OP720495	3,7	0	0	0	0	0	0	0	0	3,3	0	2,4	0	0	0	0	0	2,0	0	-	+	+
Je 1-288	Streptomyces	OP720496	0	2,2	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	3,8	0	0	2,5	1,5	3,0	1,4	0	-	-	+
Je 1-290	Streptomyces	OP720497	3,0	2,8	0	0	0	0	0	0	0	2,3	0	0	0	0	0	0	2,8	0	0	-	+	+
Je 1-292	Streptomyces	OP720498	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	+
Je 1-293	Streptomyces	OP720499	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-296	Streptomyces	OP720500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	1,1	0	0	0	0	0	-	-	+
Je 1-297	Streptomyces	OP720501	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,2	0	0	-	-	-
Je 1-298	Streptomyces	OP720502	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	+
Je 1-302	Streptomyces	OP720503	4,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,4	0	3,8	0	0	0	0	0	-	+	+

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Je 1-303	Streptomyces	OP720504	3,3	2,8	0	0	0	0	0	0	0	2,8	0	3,5	0	3,3	2,4	1,8	3,3	1,4	-	-	-	
Je 1-304	Streptomyces	OP720505	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-308	Streptomyces	OP720506	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-311	Streptomyces	OP720507	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-312.2	Streptomyces	OP720508	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,2	0	-	-	-
Je 1-313	Streptomyces	OP720509	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-314	Streptomyces	OP720510	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-324	Streptomyces	OP720511	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-328	Streptomyces	OP720512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-329	Streptomyces	OP720513	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,1	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-330	Streptomyces	OP720514	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-331.1	Streptomyces	OP720515	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-331.2	Streptomyces	OP720516	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-332	Streptomyces	OP720517	3,3	6,0	0	0	0	0	0	0	0	3,8	0	5,7	0	6,7	0	0	0	0	0	-	+	-
Je 1-334	Streptomyces	OP720518	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-336	Streptomyces	OP720519	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-337	Streptomyces	OP720520	3,5	3,3	0	0	0	0	0	0	0	4,6	0	5,0	0	4,0	0	0	0	0	0	-	+	-
Je 1-339	Promicromonospora	OP720521	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-340	Streptomyces	OP720522	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-341	Streptomyces	OP720523	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	+
Je 1-351	Nocardia	OP720524	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-352	Streptomyces	OP720525	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-353	Streptomyces	OP720526	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-355	Streptomyces	OP720527	3,1	2,3	0	0	0	0	0	0	0	2,8	0	2,5	0	3,1	2,3	2,0	0	1,4	-	-	+	
Je 1-358	Streptomyces	OP720528	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6	2,0	1,6	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-362	Streptomyces	OP720529	0	2,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-365	Streptomyces	OP720530	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,8	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-368	Streptomyces	OP720531	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0	0	0	0	1,6	-	-	-	
Je 1-369	Streptomyces	OP720532	2,4	0	0	3,3	3,0	3,3	0	2,4	2,9	2,5	2,4	2,6	2,5	2,0	2,3	1,9	2,7	1,1	-	-	-	
Je 1-370	Streptomyces	OP720533	2,4	0	0	2,8	2,6	4,2	1,7	1,9	2,5	2,0	1,6	2,0	2,0	2,0	2,5	2,6	1,6	1,9	-	-	-	
Je 1-372	Streptomyces	OP720534	3,1	2,6	0	0	0	0	0	0	0	2,4	0	2,3	0	2,8	1,9	1,8	2,5	1,8	-	-	+	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Je 1-374	Streptomyces	OP720535	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	1,7	1,7	0	1,7	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-377	Streptomyces	OP720536	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0	2,2	0	0	0	0	1,6	4,0	-	-	-
Je 1-379	Streptomyces	OP720537	1,3	1,8	0	0	0	1,3	0	0	0	1,4	1,2	2,2	1,3	2,0	1,3	0	0	1,6	-	-	-
Je 1-382	Streptomyces	OP720538	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	-	-	-
Je 1-386	Streptomyces	OP720539	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0	3,5	-	-	-
Je 1-387	Streptomyces	OP720540	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	0	3,8	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-388	Streptomyces	OP720541	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-392	Streptomyces	OP720542	0	0	3,0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,5	0	3,0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-393	Streptomyces	OP720543	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-394	Streptomyces	OP720544	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-395	Streptomyces	OP720545	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-397	Streptomyces	OP720546	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4	0	-	-	-
Je 1-398	Streptomyces	OP720547	4,8	0	0	0	0	0	0	0	0	3,4	0	2,4	0	5,3	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-399	Streptomyces	OP720548	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	0	0	1,8	3,8	-	-	-
Je 1-400	Streptomyces	OP720549	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-401	Streptomyces	OP720550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-402	Streptomyces	OP720551	0	2,8	0	0	0	0	0	0	0	3,4	0	3,7	0	4,7	0	0	0	0	-	+	+
Je 1-403	Streptomyces	OP720552	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-404	Streptomyces	OP720553	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,8	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-408	Streptomyces	OP720554	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-409	Streptomyces	OP720555	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-410	Streptomyces	OP720556	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-412	Rhodococcus	OP720557	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,8	0	-	-	-
Je 1-413	Streptomyces	OP720558	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0	0	2,8	0	0	2,5	3,3	-	-	-
Je 1-414	Streptomyces	OP720559	3,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,2	0	0	0	2,5	-	-	-
Je 1-415	Sacharopolyspora	OP720560	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-416	Streptomyces	OP720561	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-420	Streptomyces	OP720562	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	-	-	-
Je 1-423	Streptomyces	OP720563	12,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,6	2,3	2,0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-424	Streptomyces	OP720564	4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,4	0	5,5	0	0	2,4	1,3	2,4	1,4	-	-	-
Je 1-425	Streptomyces	OP720565	6,5	5,1	0	0	0	0	0	0	0	6,0	0	6,3	0	6,6	2,0	2,7	2,5	2,3	-	-	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Je 1-426	Streptomyces	OP720566	2,3	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	2,6	0	2,3	1,4	1,1	2,8	1,7	-	-	-
Je 1-430	Streptomyces	OP720567	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	2,8	0	0	0	1,1	0	0	0	3,8	-	-	-
Je 1-432	Streptomyces	OP720568	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,7	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-433	Streptomyces	OP720569	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-434	Streptomyces	OP720570	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-437.1	Streptomyces	OP720571	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-437.2	Streptomyces	OP720572	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-438	Streptomyces	OP720573	0	0	2,0	0	0	0	0	0	0	0	1,4	0	0	1,8	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-442	Streptomyces	OP720574	3,3	3,3	0	0	0	0	2,5	0	0	2,9	0	3,7	0	3,5	3,1	0	2,7	1,6	-	-	+
Je 1-444	Streptomyces	OP720575	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	2,3	0	2,0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-445.1	Streptomyces	OP720576	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-445.2	Streptomyces	OP720577	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-447	Amycolatopsis	OP720578	5,6	2,5	0	0	0	0	0	0	0	4,0	0	2,5	0	5,0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-450	Streptomyces	OP720579	7,5	0	3,3	0	0	0	0	0	0	0	0	6,0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-451	Streptomyces	OP720580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,3	2,0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-452.1	Streptomyces	OP720581	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0	2,5	1,7	3,3	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-456	Streptomyces	OP720582	2,0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,2	0	1,8	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-461	Streptomyces	OP720583	1,5	2,3	0	0	0	0	0	0	0	1,1	0	4,0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-463	Streptomyces	OP720584	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	+	-
Je 1-464	Streptomyces	OP720585	2,0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,3	0	2,8	0	2,4	0	0	2,6	0	-	-	-
Je 1-465	Streptomyces	OP720586	2,0	0	0	0	0	0	1,4	0	0	0	0	1,5	0	3,5	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-466	Streptomyces	OP720587	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0	2,2	1,5	2,8	0	1,8	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-467	Streptomyces	OP720588	2,0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	0	0	1,8	0	-	-	-
Je 1-470	Streptomyces	OP720589	3,3	2,6	0	0	0	0	0	0	0	2,4	2,2	2,8	1,5	2,0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-471	Streptomyces	OP720590	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	3,0	2,3	24	0	2,0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-473	Streptomyces	OP720591	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-475	Streptomyces	OP720592	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-477	Streptomyces	OP720593	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-478.1	Streptomyces	OP720594	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-478.2	Streptomyces	OP720595	0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	1,3	0	0	0	1,1	-	-	-
Je 1-478.3	Streptomyces	OP720596	1,8	0	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	1,7	1,1	1,7	0	0	0	0	-	-	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Je 1-479	Streptomyces	OP720597	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-480.1	Streptomyces	OP720598	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-480.2	Streptomyces	OP720599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-481	Streptomyces	OP720600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-485	Streptomyces	OP720601	1,9	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0	0	0	0	2,0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-486	Streptomyces	OP720602	1,5	1,8	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	2,0	0	2,6	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-487	Streptomyces	OP720603	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-489	Streptomyces	OP720604	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-490	Streptomyces	OP720605	2,5	0	2,2	1,3	2,8	2,3	0	2,8	0	4,5	5,3	5,0	3,0	2,1	4,0	2,5	0	0	-	+	-	
Je 1-493	Streptomyces	OP720606	0	0	0	0	0	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-494	Streptomyces	OP720607	0	0	0	0	0	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	+
Je 1-500	Micromonospora	OP720608	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-505	Micromonospora	OP720609	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-518	Streptomyces	OP720610	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-525	Streptomyces	OP720611	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-526	Micromonospora	OP720612	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-527	Micromonospora	OP720613	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-528.1	Micromonospora	OP720614	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-528.2	Micromonospora	OP720615	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-529	Streptomyces	OP720616	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	+
Je 1-532	Micromonospora	OP720617	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-534	Streptomyces	OP720618	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-540	Streptomyces	OP720619	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-541	Micromonospora	OP720620	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-544	Streptomyces	OP720621	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-545	Streptomyces	OP720622	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-548	Streptomyces	OP720623	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-549	Streptomyces	OP720624	0	1,7	2,3	2,0	4,5	0	1,6	3,0	0	3,4	2,6	3,6	3,0	3,1	4,0	4,3	3,6	0	-	+	-	
Je 1-550	Streptomyces	OP720625	0	1,3	0	0	0	0	1,6	0	0	2,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-551	Streptomyces	OP720626	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-556	Streptomyces	OP720627	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Je 1-558	Streptomyces	OP720628	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,8	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-559	Streptomyces	OP720629	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-562	Streptomyces	OP720630	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-565	Streptomyces	OP720631	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-567	Actinoplanes	OP720632	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-568	Streptomyces	OP720633	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-569	Streptomyces	OP720634	2,8	2,5	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	2,9	0	2,8	1,4	1,8	0	1,5	-	-	+	
Je 1-571	Actinorectispora	OP720635	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4	1,3	1,5	0	0	1,8	0	-	-	-	
Je 1-573	Streptomyces	OP720636	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-574	Streptomyces	OP720637	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-577	Streptomyces	OP720638	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-579	Streptomyces	OP720639	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	+
Je 1-589	Streptomyces	OP720640	3,3	2,2	0	0	0	0	0	0	0	1,9	0	2,6	0	2,4	0	0	0	0	0	-	-	+
Je 1-590	Streptomyces	OP720641	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6	1,2	1,6	0	-	-	-	
Je 1-591	Streptomyces	OP720642	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0	1,2	0	1,8	-	-	-	
Je 1-593	Streptomyces	OP720643	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-595	Kribbella	OP720644	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-596	Streptomyces	OP720645	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-597	Streptomyces	OP720646	2,9	2,5	0	0	0	0	0	0	0	2,2	0	3,8	0	3,2	1,8	1,8	0	1,1	-	-	-	
Je 1-598	Streptomyces	OP720647	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-599	Streptomyces	OP720648	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-600	Micrococcus	OP720649	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-601	Streptomyces	OP720650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-605	Streptomyces	OP720651	1,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-607	Streptomyces	OP720652	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-608	Streptomyces	OP720653	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-609	Streptomyces	OP720654	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-611	Streptomyces	OP720655	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-612	Streptomyces	OP720656	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-613	Streptomyces	OL636374	2,0	0	0	0	0	0	0	1,8	0	2,6	0	2,4	0	3,3	2,0	1,5	4,0	1,4	+	-	-	
Je 1-614	Streptomyces	OP720657	4,0	2,4	0	0	0	0	0	0	0	2,8	0	3,0	0	3,8	1,9	2,0	0	1,4	-	-	-	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Je 1-615	Streptomyces	OP720658	2,8	2,9	0	0	0	0	0	0	0	3,4	0	2,7	0	2,5	2,2	1,6	0	1,6	-	-	-	
Je 1-617	Streptomyces	OP720659	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	3,1	1,8	-	-	-	
Je 1-619	Streptomyces	OP720660	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	0	0	0	0	3,4	0	-	-	-	
Je 1-620	Streptomyces	OP720661	1,7	1,7	3,0	1,6	5,0	4,0	1,3	0	0	2,7	3,0	2,0	2,3	2,4	3,0	4,0	0	2,5	-	+	-	
Je 1-631	Streptomyces	OP720662	0	0	0	0	4,0	6,0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0	2,5	0	0	-	-	-	
Je 1-634	Streptomyces	OP720663	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-635	Streptomyces	OP720664	0	0	0	0	4,5	5,0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,2	1,7	0	1,5	-	-	-	
Je 1-637	Streptomyces	OP720665	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2	1,4	0	0	-	-	-	
Je 1-640	Streptomyces	OP720666	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Je 1-643	Streptomyces	OP720667	4,3	2,2	0	0	0	0	0	0	0	3,3	0	3,5	0	3,0	3,0	2,	0	1,8	-	-	+	
Je 1-646	Streptomyces	OP720668	0	0	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	-	-	-	
Je 1-647	Streptomyces	OP720669	2,8	2,2	0	0	0	0	0	0	0	2,2	0	3,0	0	8,0	2,5	1,7	2,0	1,9	-	-	+	
Je 1-650	Streptomyces	OP720670	3,7	2,9	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	2,9	0	3,3	2,4	4,	0	1,8	-	-	-	
Je 1-651	Streptomyces	OP720671	4,3	3,0	4,5	0	6,0	5,0	3,0	3,2	0	3,8	5,3	4,0	3,2	3,2	4,6	0	2,0	1,6	-	+	-	
Je 1-652	Streptomyces	OP720672	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	+	
Je 1-653	Streptomyces	OP720673	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4	0	2,8	0	0	0	1,2	-	-	-	
Je 1-656	Streptomyces	OP720674	0	0	0	0	0	0	1,8	0	0	0	0	0	0	1,6	2,0	0	1,3	-	-	-	-	
Je 1-658	Streptomyces	OP720675	2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,3	4,0	0	4,3	0	0	0	0	-	-	-	
Je 1-666	Amycolatopsis	OP720676	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	3,0	0	1,1	0	6,0	0	1,3	0	1,2	-	+	-	
Je 1-668	Amycolatopsis	OP720677	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-

Таблиця Б.2

Штами інших мікроорганізмів використані в роботі

Штам	Характеристика	Джерело
1	2	3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 31324	Типовий штам.	Колекція культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків (ККМПА)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Типовий штам.	ККМПА
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Типовий штам.	ККМПА
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Типовий штам.	ККМПА
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 13883	Типовий штам.	ККМПА
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 29905	Типовий штам.	ККМПА
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	Типовий штам.	ККМПА
<i>P. syringae</i> IMB 8511	Дикий тип, фітопатоген, збудник обмороження та плямистості рослин.	ККМПА
<i>P. fluorescens</i> IMB 8573	Дикий тип, фітопатоген, збудник м'якої гнилі у рослин.	ККМПА
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> IMB 4012	Дикий тип, фітопатоген, збудник кутастої плямистості квасолі.	ККМПА
<i>Pectobacterium carotovorum</i> IMB 8982	Дикий тип, фітопатоген, збудник м'якої гнилі та чорної ніжки картоплі.	ККМПА
<i>Xantomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> IMB8003	Дикий тип, фітопатоген, збудник судинного бактеріозу широкого кола сільськогосподарських культур.	ККМПА
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IMB 8628	Дикий тип, фітопатоген, що спричиняє утворення корончастих галів.	ККМПА
<i>Erwinia amylovora</i>	Дикий тип, фітопатоген, збудник	ККМПА

<i>Mi2</i>	бактеріального опіку плодових культур.	
<i>Fusarium oxysporum</i> IMB 54201	Дикий тип, фітопатоген, що спричиняє гниль томатів.	ККМПА
<i>Botrytis cinerea</i> IMB 2306	Дикий тип, фітопатоген, збудник сірої гнилі рослин.	ККМПА
<i>Aspergillus niger</i> IMB 16706	Дикий тип, патоген, збудник аспергильозу не тільки в рослин, а і тварин та людини.	ККМПА
<i>Alternaria alternata</i> DSM 1102	Дикий тип, фітопатоген, спричиняє гниль томатів.	ККМПА
<i>B. subtilis</i> DSM 10	Типовий штам.	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSM)
<i>S. aureus</i> Newman	клінічний ізолят, виділений у 1952 році.	DSM
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC ² 155	Дикий тип	DSM
<i>E. coli</i> BW25113	Дикий тип	DSM
<i>E. coli</i> Δ <i>acrB</i> JW0451-2	Мутантний штам, у якого відсутній домінуючий компонент ефлюксної помпи RND <i>acrB</i> [F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), Δ <i>acrB</i> 747:: <i>kan</i> , λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514]	DSM
<i>P. aeruginosa</i> PA14	патоген, який має численну стійкість до антибіотиків.	DSM
<i>Acinetobacter baumannii</i> DSM 30008	патоген, який має численну стійкість до антибіотиків.	DSM
<i>Citrobacter freundii</i> DSM 30039	Типовий штам.	DSM
<i>C. albicans</i> DSM 1665	Типовий штам.	DSM
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> DSM 11959	Штам грибів, виділений із спинномозкової рідини.	DSM
<i>Pichia anomala</i> DSM 6766	Типовий штам.	DSM
<i>Mucor hiemalis</i> DSM 2656	Типовий штам.	DSM
<i>S. lividans</i> TK24 рМО16	Похідний <i>S. lividans</i> TK24 із плазмідною рМО16, в якій експресія гена резистентності до неоміцину/ канаміцину знаходиться під контролем	ККМПА

	тіострептон-індуцибельного промотора. Використовували для скринінгу продуцентів тіотептидних антибіотиків.	
<i>S. sioyaensis</i> NRRL-B5408	Дикий тип, продуцент сіоміцину.	ККМПА
<i>S. coelicolor</i> M145	Похідний штаму <i>S. coelicolor</i> A3(2), не містить плазмід SCP1 та SCP2.	ККМПА
<i>B. subtilis</i> HB09050	синтезує β -галактозидазу у відповідь на індукцію <i>liaI</i> _p антибіотиками, які пригнічують синтез клітинної стінки у бактерій (MB5826, CU1065 SPb P- <i>liaI</i> ₇₄ - <i>cat-lacZ</i>)	[48]
<i>A. teichomyceticus</i> NRRL-B16726	Дикий тип, продуцент тейкопланіну та тейхоміцину.	ККМПА
<i>S. albus</i> Δ pseB4 CD10RO1	Похідний штаму <i>S. albus</i> J1074 містить лише один сайт attB актинофага ϕ C31.	ККМПА

Додаток В

Склад поживних середовищ, використаних в роботі

ISP2: дріжджовий екстракт (Difco) – 4 г/л, мальтозний екстракт (Condalab) – 10 г/л, декстроза/глюкоза (Difco) – 4 г/л, агар (Conda) – 20 г/л; pH 7,2.

ISP3: вівсяне толокно (Козуб) – 20 г/л, агар (Conda) – 18 г/л; pH – 7,2.

ISP4: крохмаль розчинний (Difco) – 10 г/л, K_2HPO_4 (Хімреактив) – 1 г/л, $MgSO_4 \times 7 H_2O$ (Хімреактив) – 1 г/л, NaCl (СфераСім) – 1 г/л, $(NH_4)_2SO_4$ (Merck) – 2 г/л, $CaCO_3$ – 2 г/л, $FeSO_4 \times 7H_2O$ (Merck) – 0,001 г/л, $MnCl_2 \times 7H_2O$ (Хімреактив) – 0,001 г/л, $ZnSO_4 \times 7H_2O$ (Хімреактив) – 0,001 г/л, агар (Conda) – 20 г/л; pH – 7,2.

Середовище Бенета: глюкоза (Difco) – 10 г/л; пептон (Difco) – 1 г/л; дріжджовий екстракт (Sigma Aldrich) – 1 г/л, триптон (Difco) – 2 г/л; агар (Conda) – 20 г/л.

Середовище YEM: K_2HPO_4 (СфераСім) – 0,5 г/л, $MgSO_4 \times 7H_2O$ (Хімреактив) – 0,2 г/л, NaCl (СфераСім) – 0,1 г/л, дріжджовий екстракт (Sigma-Aldrich) – 0,5 г/л, маніт – 10 г/л (СфераСім), агар (Conda) – 15 г/л; pH 7,0.

Середовище Муромцева: глюкоза (Difco) – 10 г/л, аспарагін (СфераСім) – 1 г/л, K_2SO_4 (Хімреактив) – 0,2 г/л, $MgSO_4 \times 7H_2O$ (Хімреактив) – 0,2 г/л, кукурудзяний екстракт (Difco) – 0,02 г/л, агар (Conda) – 15 г/л; pH 7,0. Після стерилізації додати $CaCl_2 \times 6H_2O$ (СфераСім) – 3,3 г/л, $Na_3PO_4 \times 12H_2O$ (СфераСім) – 3,8 г/л. Після повного розчинення солей прокип'ятити.

Середовище N-free: глюкоза (Difco) – 10 г/л, KH_2PO_4 (СфераСім) – 0,41 г/л, K_2HPO_4 (СфераСім) – 0,52 г/л, Na_2SO_4 (СфераСім) – 0,05 г/л, $CaCl_2$ (СфераСім) – 0,2 г/л, $MgSO_4 \times 7H_2O$ (Хімреактив) – 0,1 г/л, $FeSO_4 \times 7H_2O$ (Хімреактив) – 0,005 г/л, $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ (СфераСім) – 0,0025 г/л, агар (Conda) – 15 г/л.

TSB: використовували готове середовище компанії Himedia, готували згідно рекомендацій виробника.

LB/LA: триптон (Sigma-Aldrich) – 10 г/л; дріжджовий екстракт (Sigma-Aldrich) – 5 г/л; NaCl (СфераСім) – 5 г/л. LA готували додавши 20 г/л агару (Conda).

Сабуро: використовували готове середовище компанії Condalab, готували згідно рекомендацій виробника.

SG: глюкоза (Difco) – 20 г/л, соєвий пептон (HiMedia) – 10 г/л, CaCO₃ (СфераСім) – 2 г/л; рН 7,2.

DNPM: декстрин (Difco) – 4 г/л, MOPS (Fisher Bioreagents) – 21 г/л, сойтон (Difco) – 7,5 г/л, пекарські дріжджі (Ензим) – 5 г/л; рН – 7,2.

SGG: глюкоза (Difco) – 10 г/л, крохмаль розчинний (Difco) – 10 г/л, гліцерин (СфераСім) – 10 г/л, кукурудзяний екстракт (Difco) – 2,5 г/л, пептон (Difco) – 5 г/л, дріжджовий екстракт (Sigma Aldrich) – 2 г/л, NaCl (СфераСім) – 1 г/л, CaCO₃ (СфераСім) – 3 г/л; рН – 7,3.

Додаток Г

Праймери, використані в роботі та їхня характеристика

Назва	Послідовність, 5'-3'	Використання
8F 1510R	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Ампліфікація ділянки (п.н.) гена 16S рРНК у штаммах актиноміцетій
510F 1371R	CCACACTGGGACTGAGACAC CACCTTCCTCCGAGTTGACC	Ампліфікація ділянки (п.н.) гена 16S рРНК у штаммах актиноміцетій
gyrBPF gyrBPR	GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGCACGCGGGCGG CAAGTTCGGC GTTGATGTGCTGGCCGTCGACGTCGGCGTCCG CCAT	Ампліфікація ділянки гена <i>gyrB</i>
gyrBF-1 gyrBR-4	GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGCA CGCTCCTTGTCTTCGGCCTC	Секвенування ділянки гена <i>gyrB</i>
rpoBPF rpoBPR	GAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGC CCTCGTAGTTGTGACCCTCCACGGCATGA	Ампліфікація ділянки гена <i>rpoB</i>
rpoBF1 rpoBR1	TTCATGGACCAGAACAACC CGTAGTTGTGACCCTCCC	Секвенування ділянки гена <i>rpoB</i>
trpBPF trpBPR	GCGCGAGGACCTGAACCACACCGGCTCACACA AGATCAACA TCGATGGCCGGGATGATGCCCTCGGTGCGCGA CAGCAGGC	Ампліфікація ділянки гена <i>trpB</i>
trpBF rpBR	GGCTCACACAAGATCAACAA TCGATGGCCGGGATGATGCC	Секвенування ділянки гена <i>trpB</i>
recAPF recAPR	CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC GCSAGGTCGGGGTTGTCCTTSAGGAAGTTGCG	Ампліфікація ділянки гена <i>recA</i>
recAF recAR	ACAGATTGAACGGCAATTCG ACCTTGTTCTTGACCACCTT	Секвенування ділянки гена <i>recA</i>
atpDPF atpDPR	GTCGGCGACTTCACCAAGGGCAAGGTGTTCAA CACC GTGAACTGCTTGGCGACGTGGGTGTTCTGGGA CAGGAA	Ампліфікація ділянки гена <i>atpD</i>
atpDF atpDR	ACCAAGGGCAAGGTGTTCAA GCCGGGTAGATGCCCTTCTC	Секвенування ділянки гена <i>atpD</i>

Додаток Д

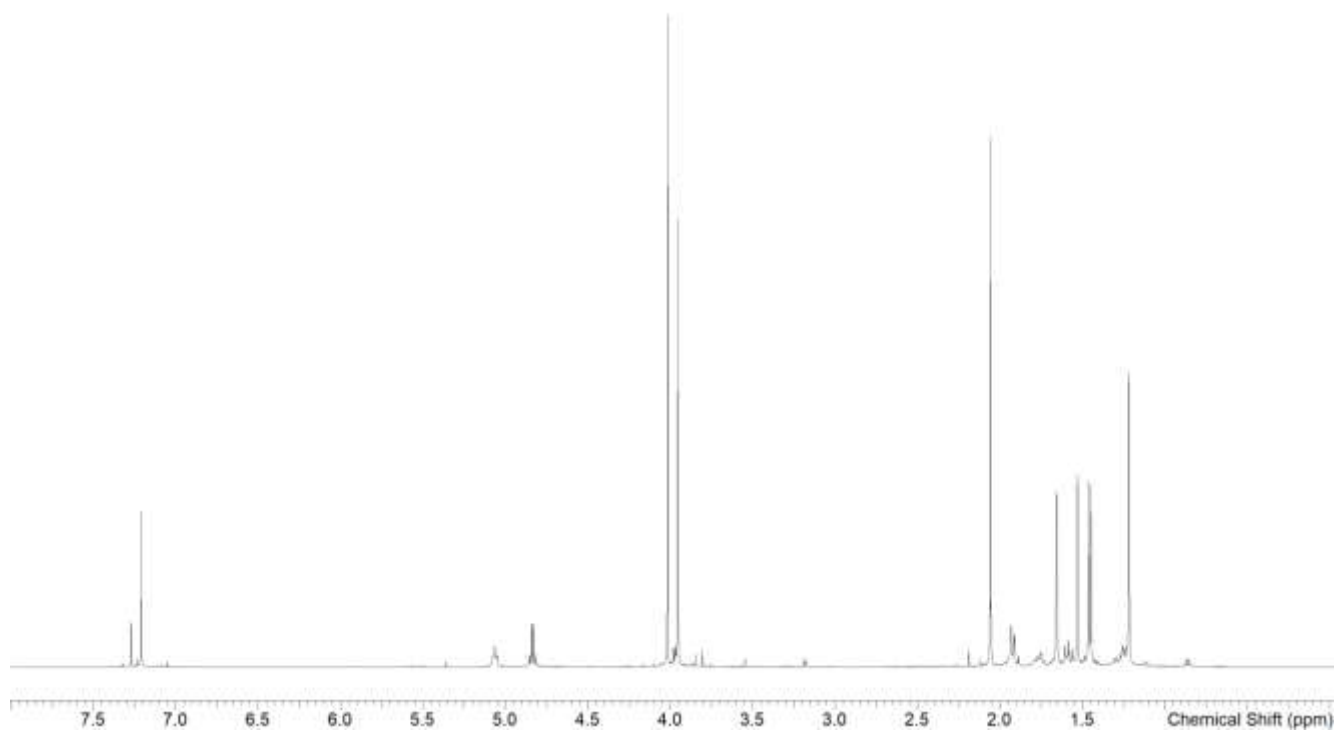


Рис. Д1. ¹H-ЯМР спектр (500 МГц, CDCl₃) фурахіноцину К.

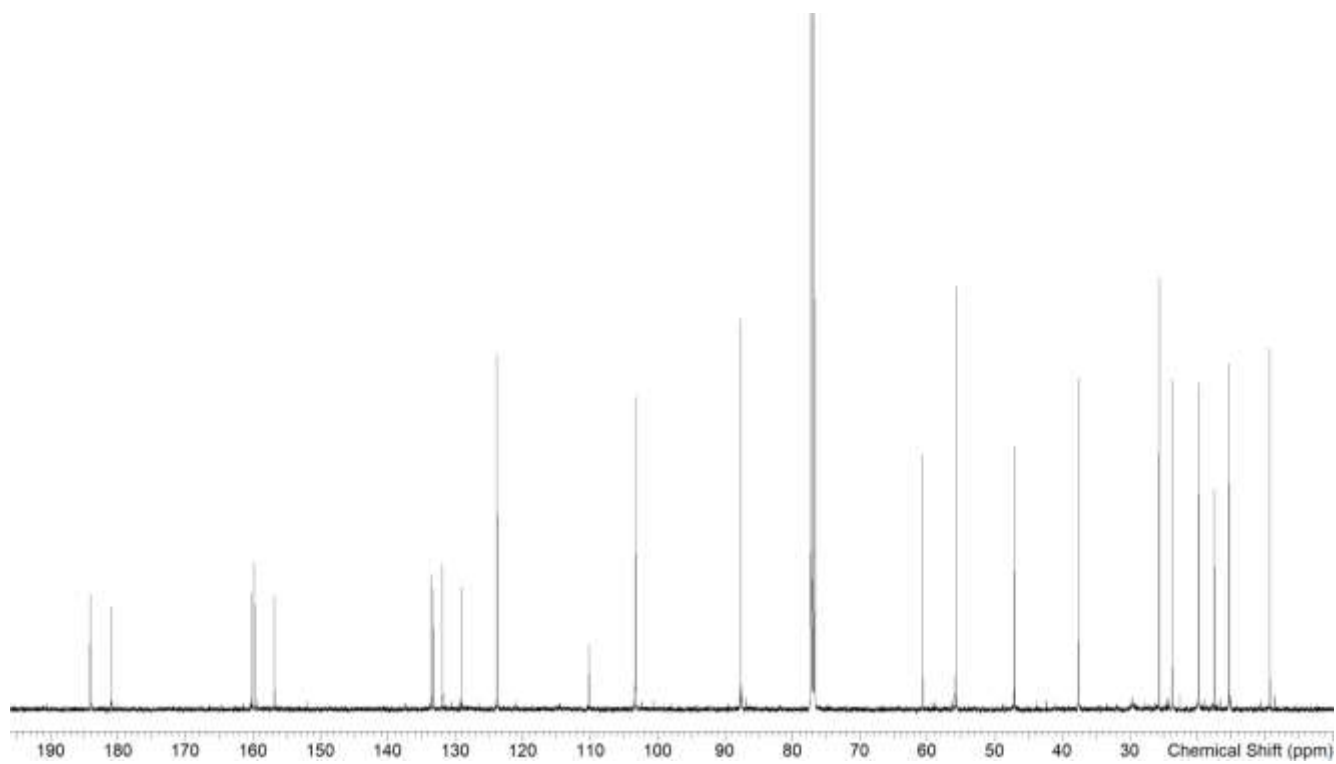


Рис. Д2. ¹³C-ЯМР спектр (125 МГц, CDCl₃) фурахіноцину К.

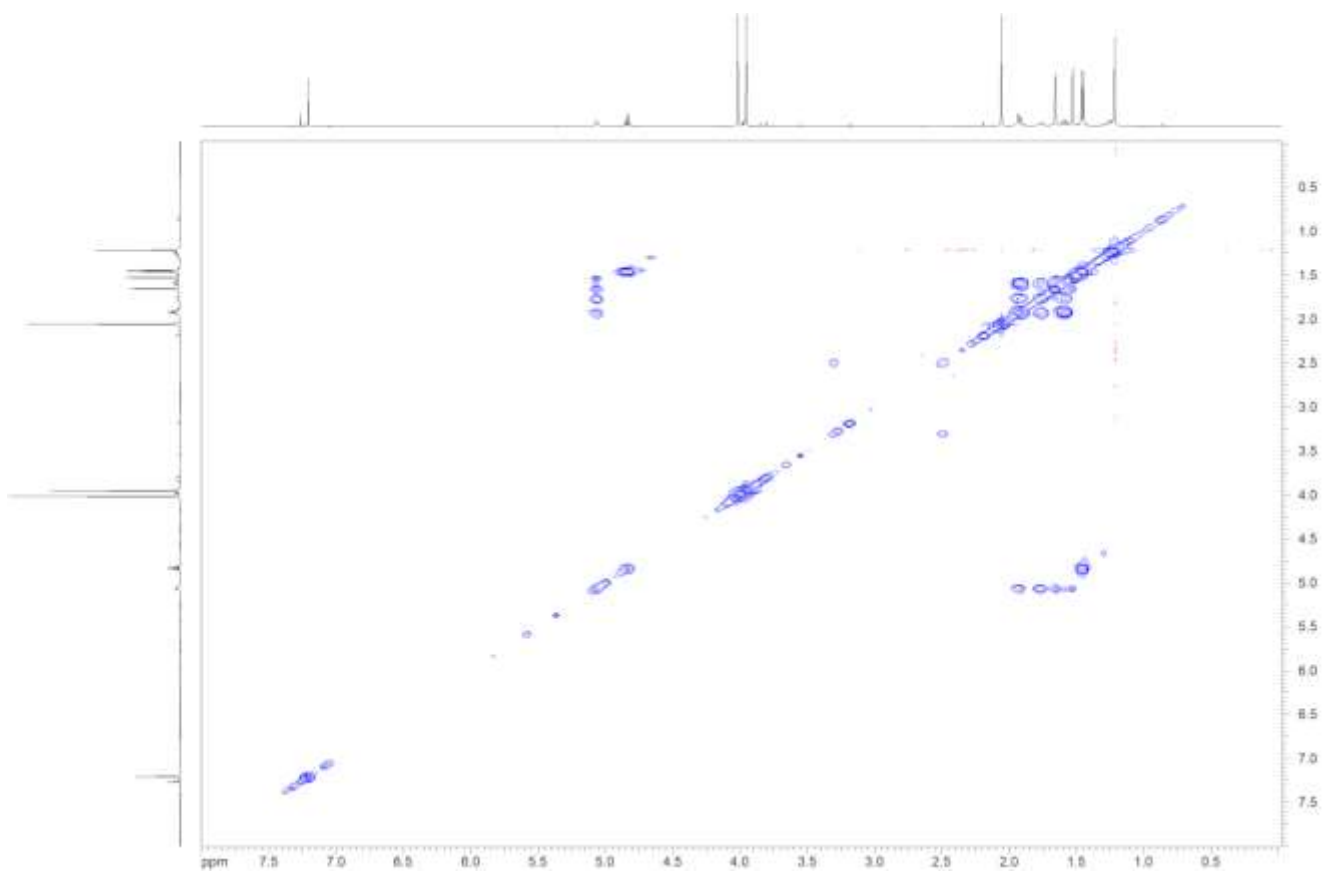


Рис. Д3. ^1H - ^1H -COSY спектр (CDCl_3) фурахіноцину К.

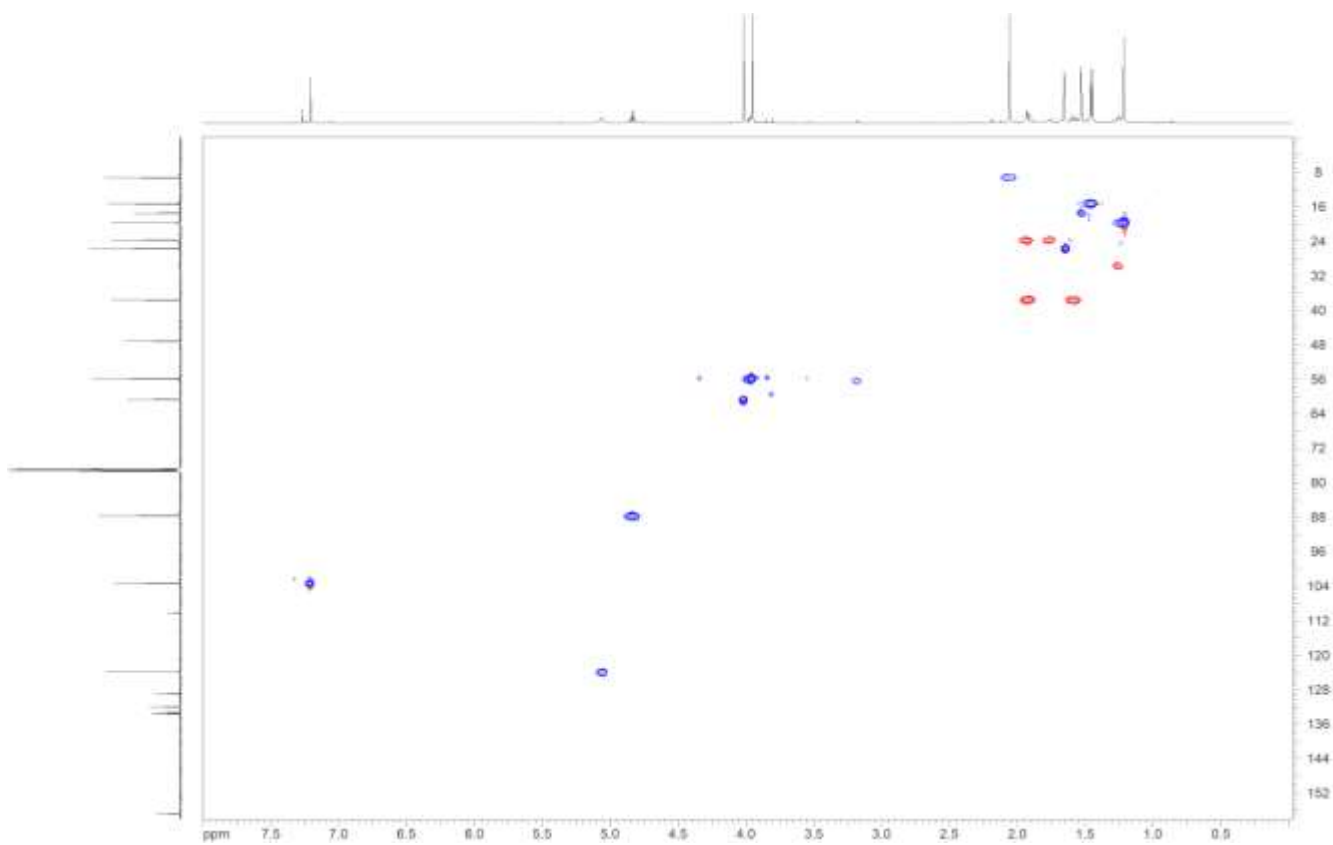


Рис. Д4. HSQC спектр (CDCl_3) фурахіноцину К.

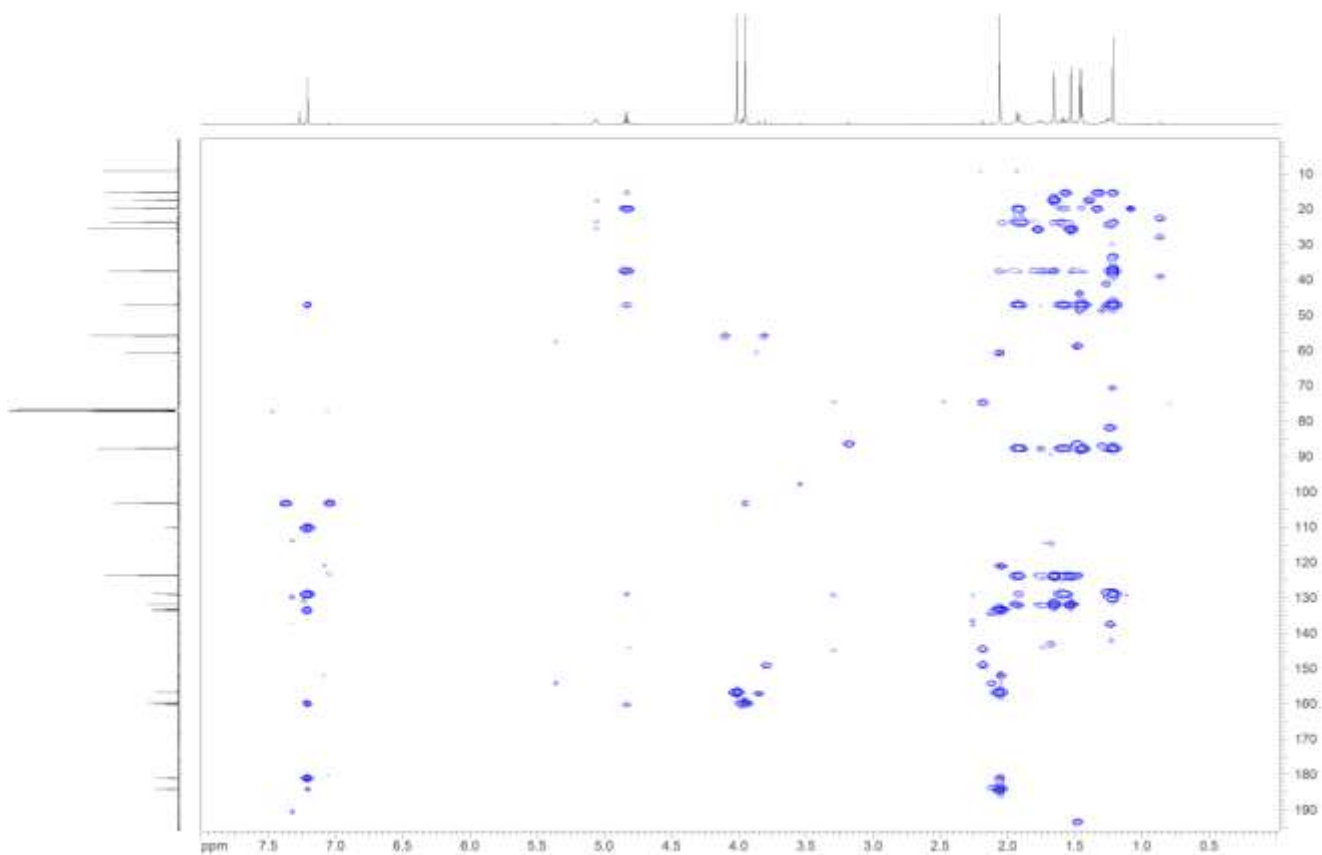


Рис. Д5. ^1H , ^{13}C -НМВС спектр (CDCl_3) фурахіноцину К.

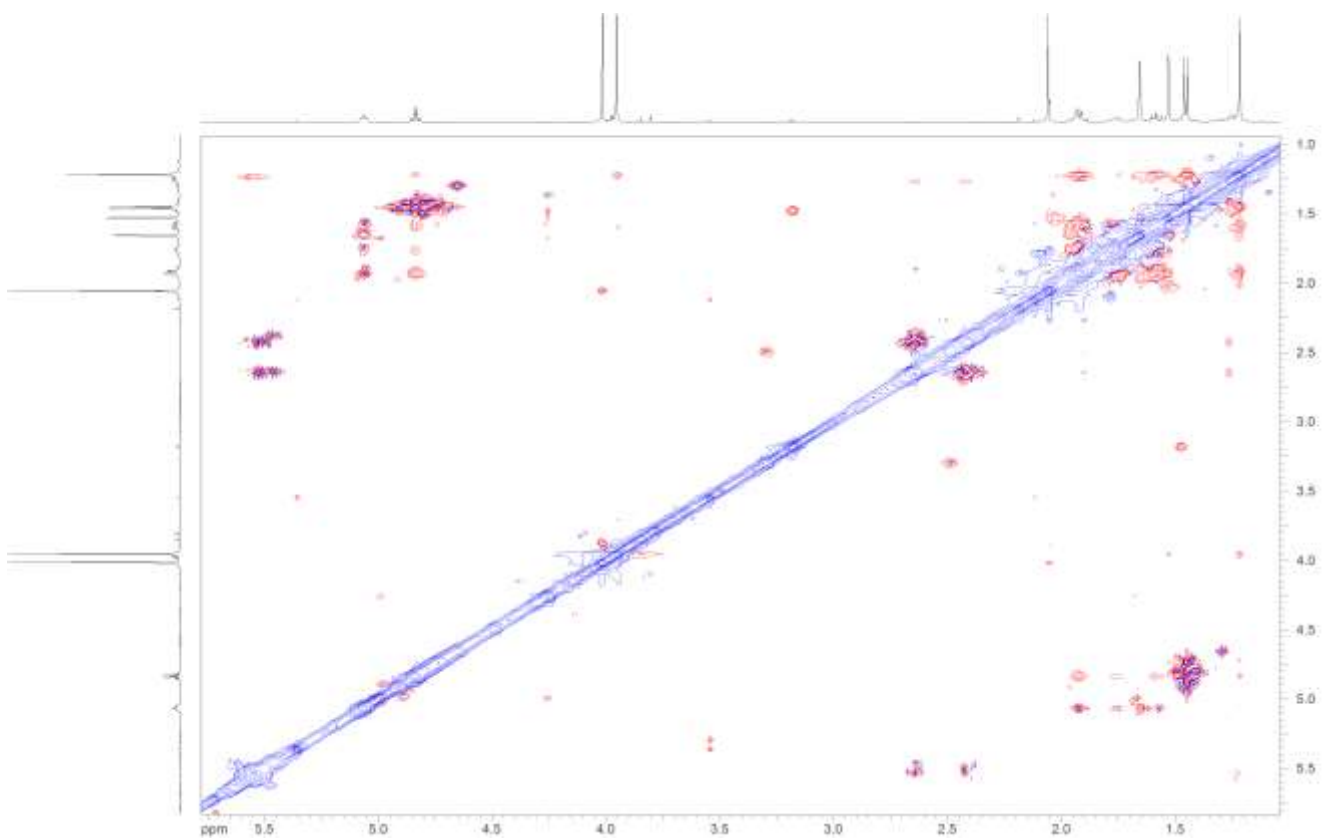


Рис. Д6. NOESY спектр (CDCl_3) фурахіноцину К.

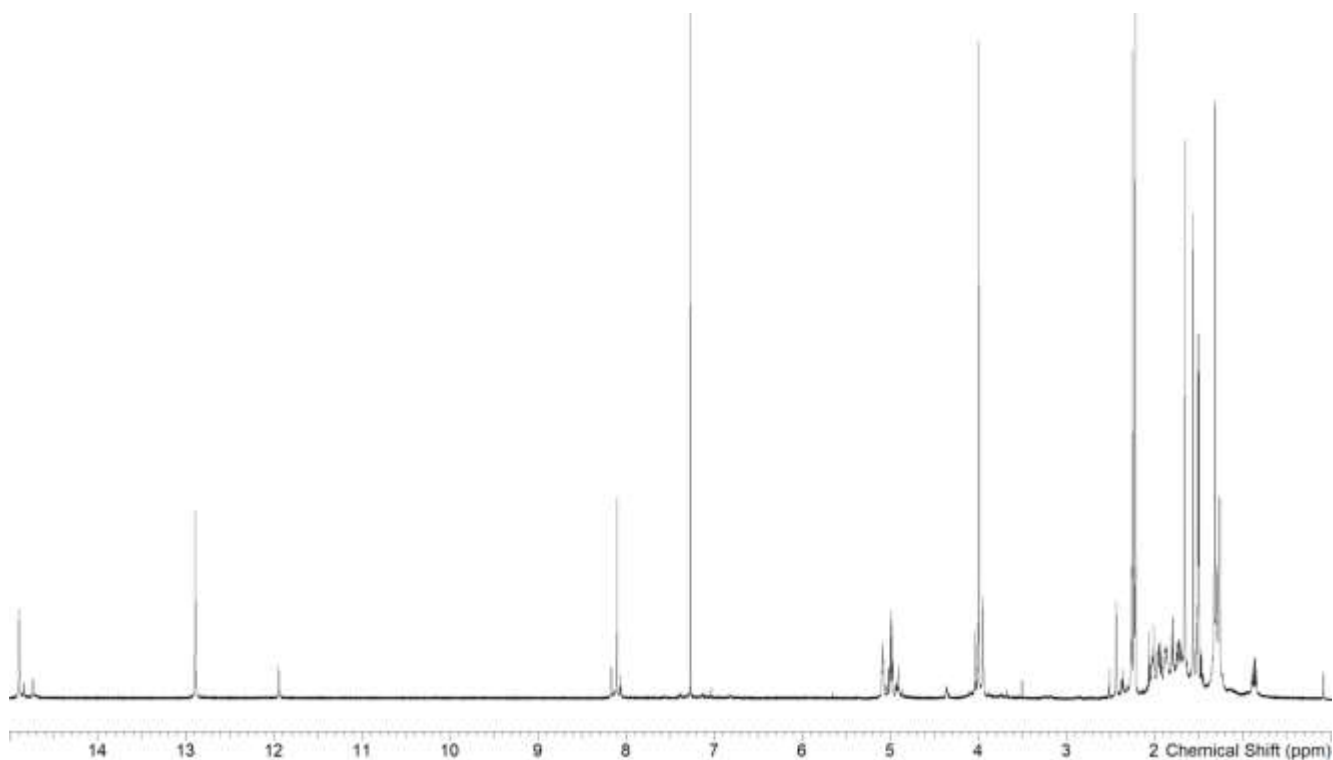


Рис. Д7. ^1H -ЯМР спектр (500 МГц, CDCl_3) фурахіноцину L.

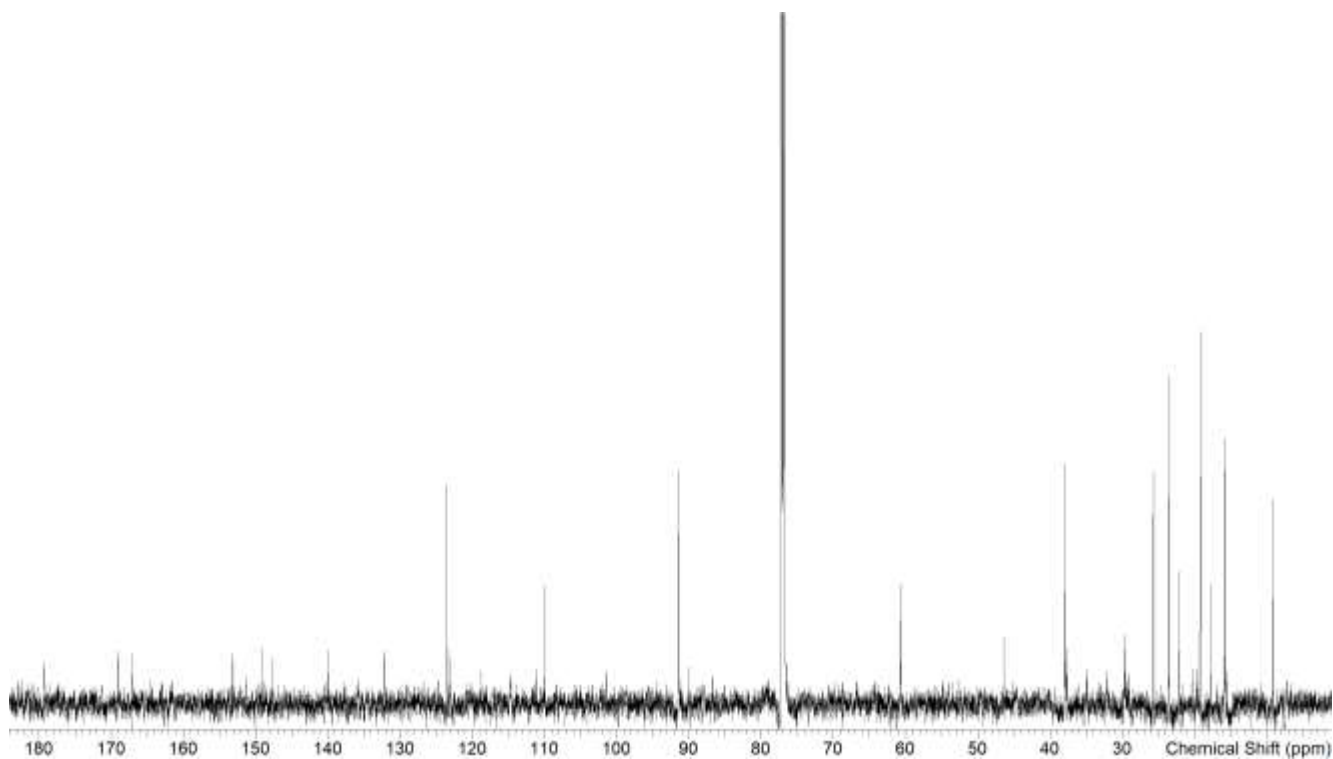


Рис. Д8. ^{13}C -ЯМР спектр (125 МГц, CDCl_3) фурахіноцину L.

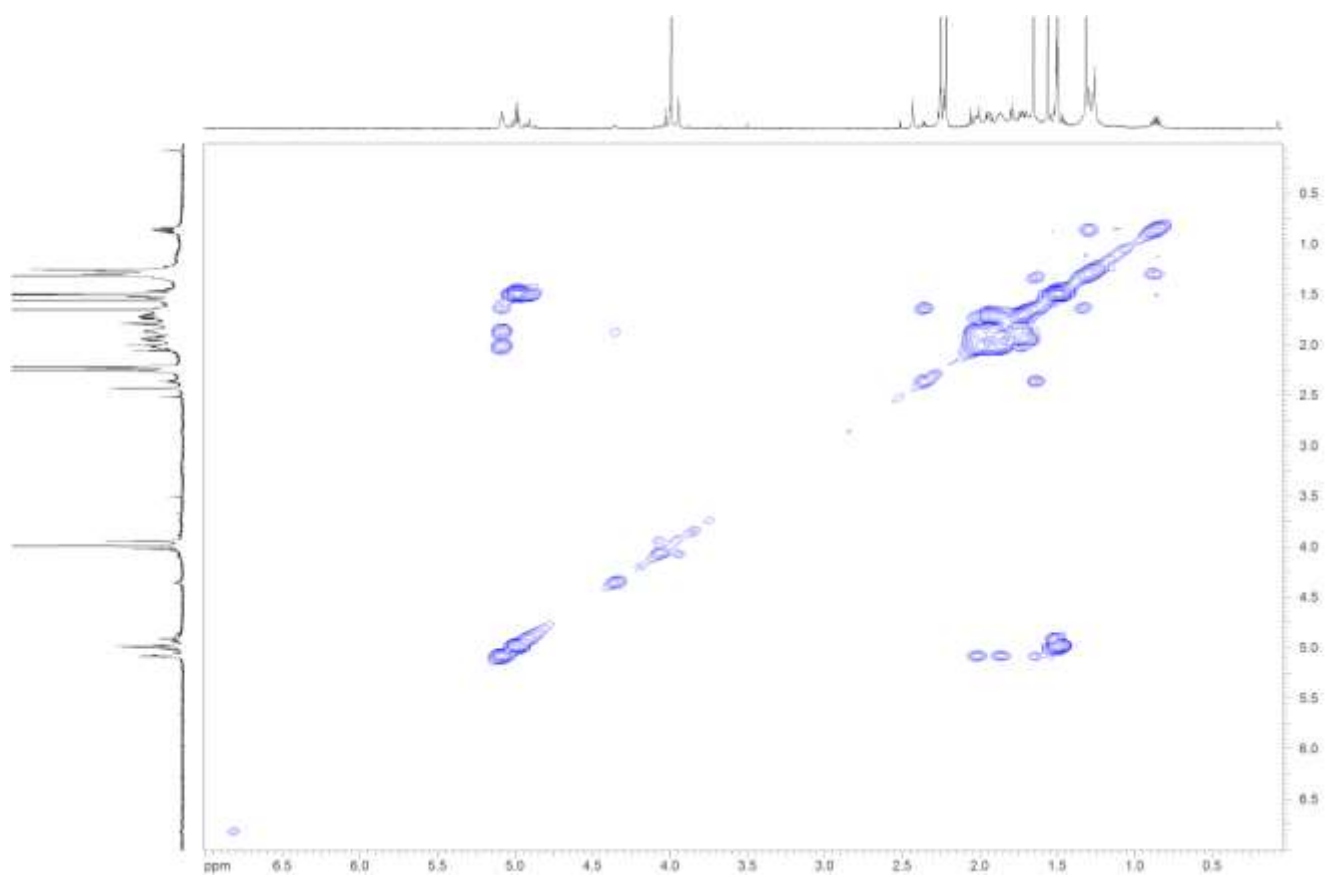


Рис. Д9. ^1H - ^1H -COSY спектр (CDCl_3) фурахіноцину L.

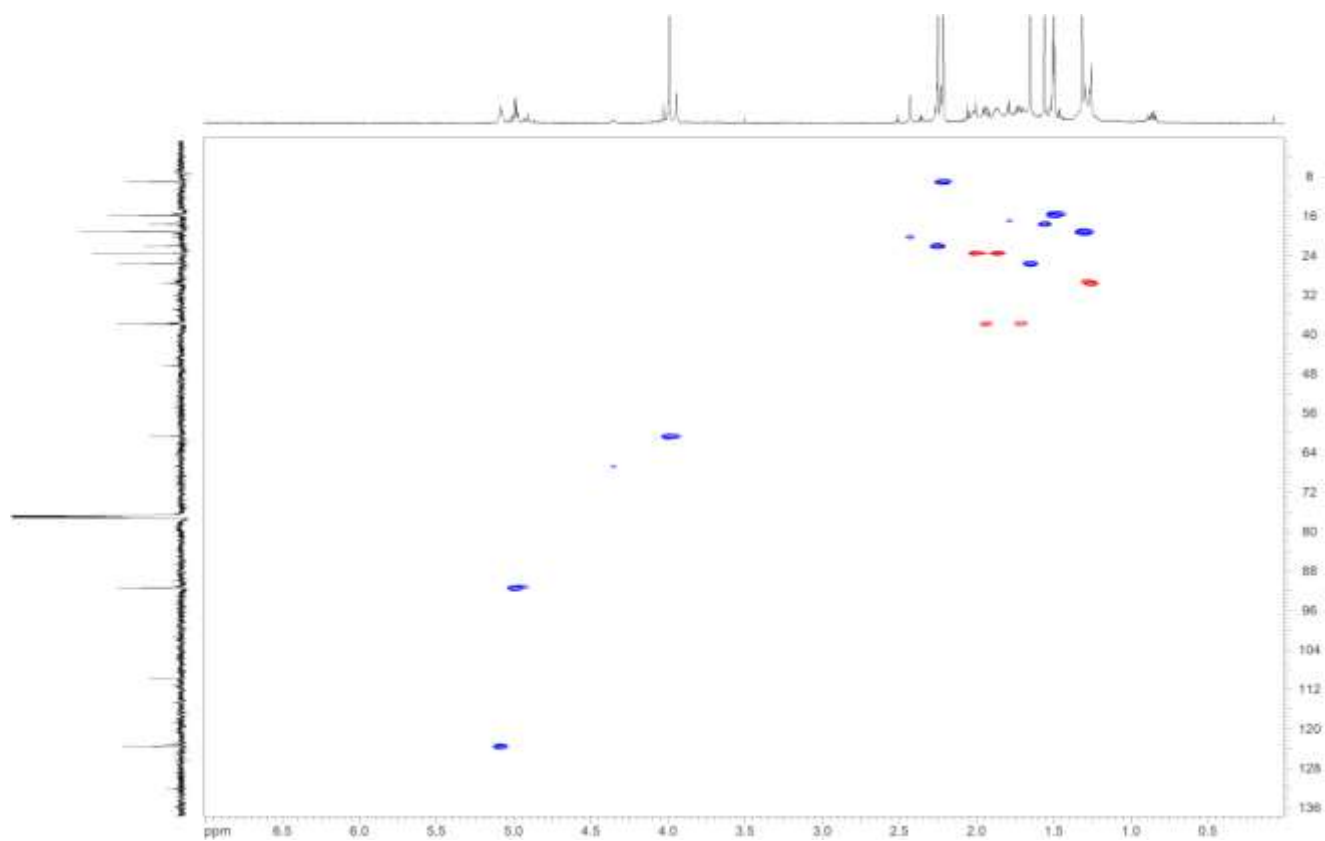


Рис. Д10. HSQC спектр (CDCl_3) фурахіноцину L.

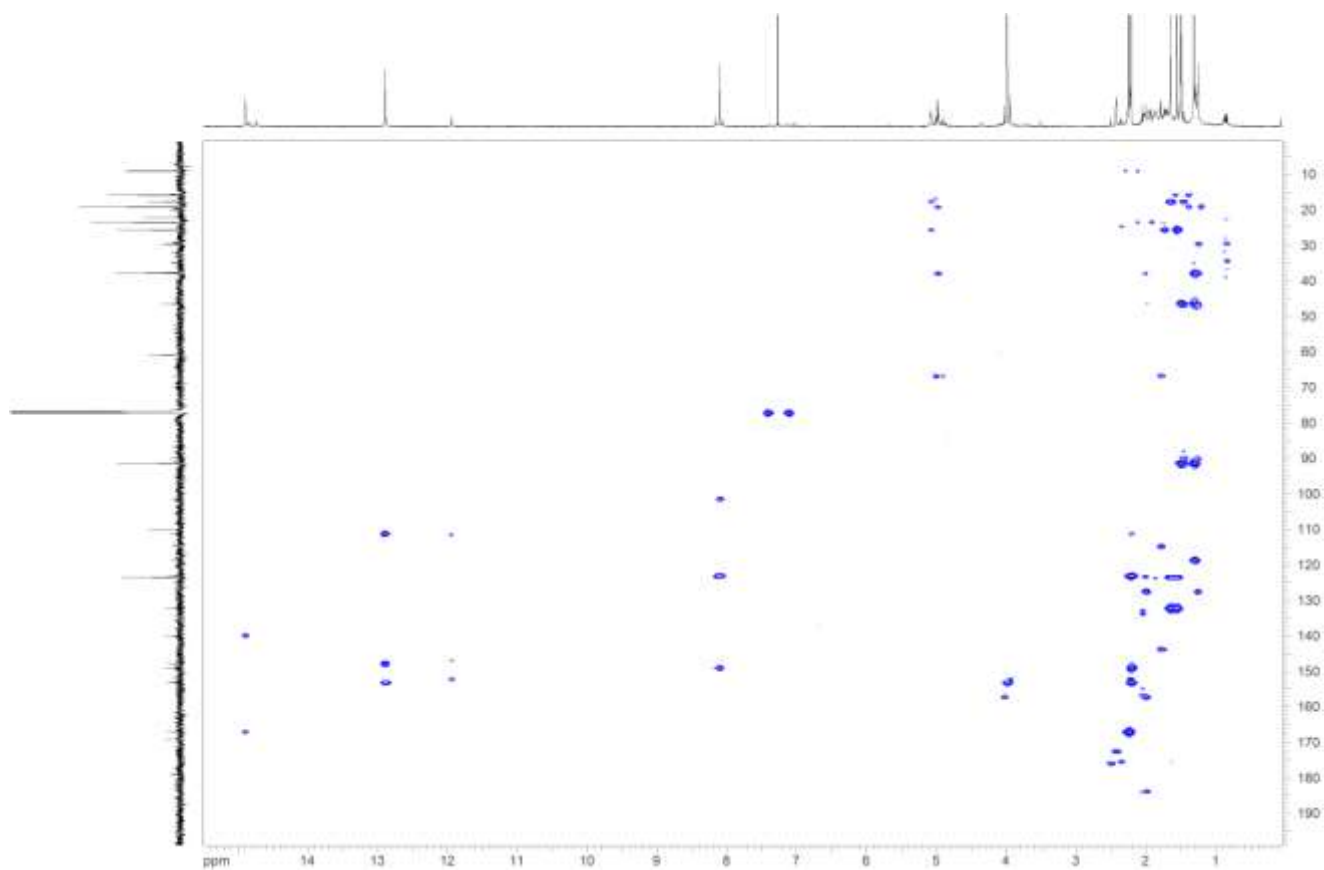


Рис. Д11. $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC спектр (CDCl_3) фурахіноцину L.

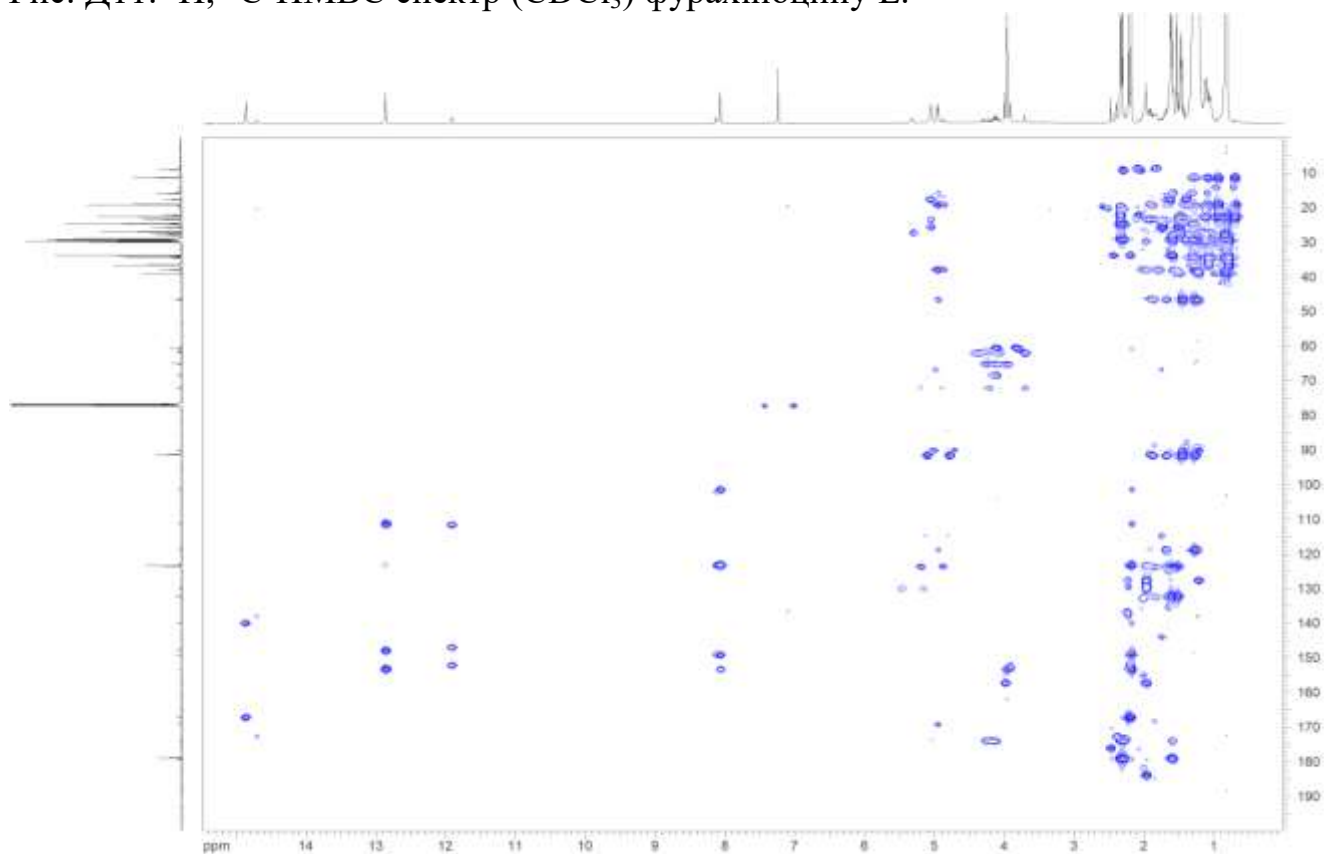


Рис. Д12. HMBC спектр (CDCl_3) фурахіноцину L з домішками, але більша кількість.

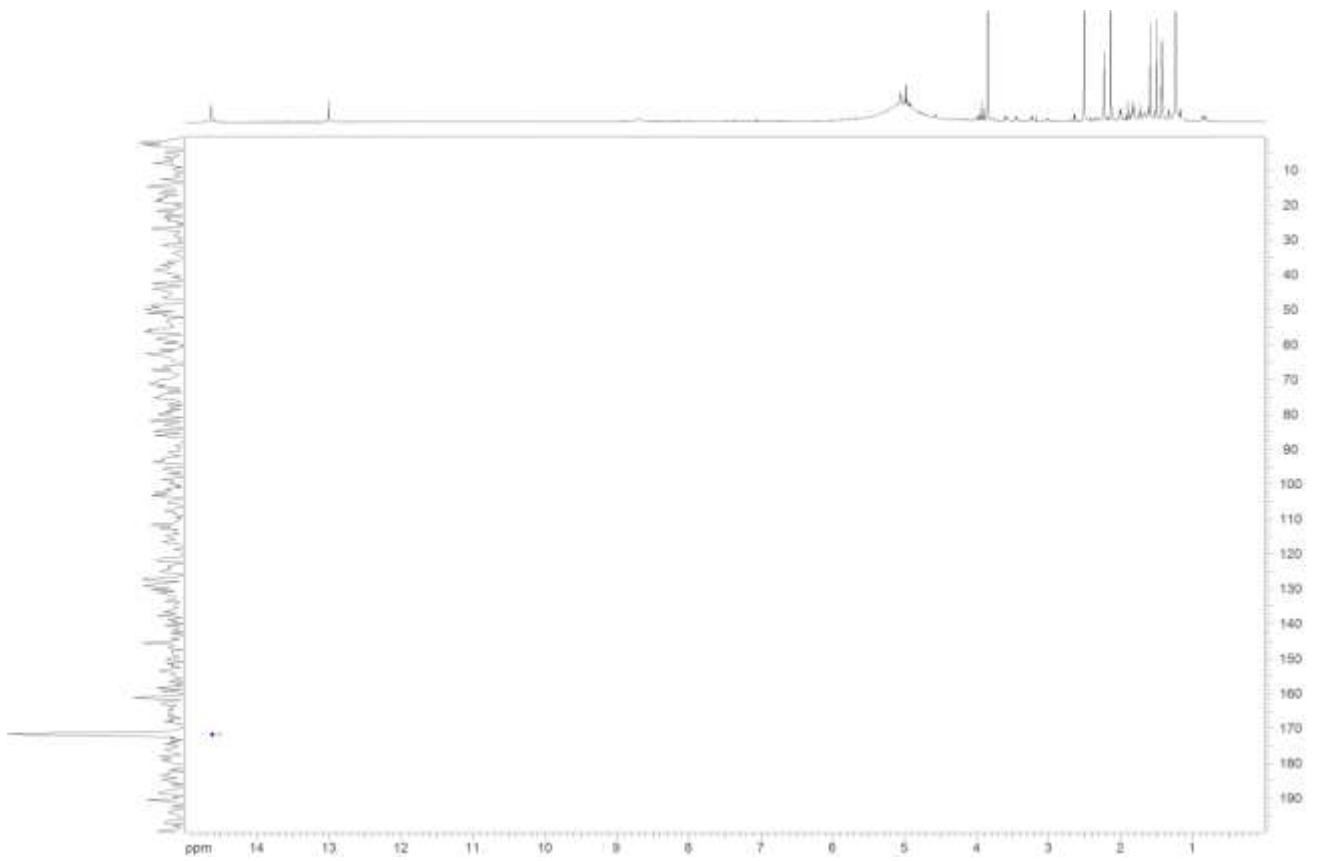


Рис. Д13. ^1H , ^{15}N -HSQC спектр (DMSO- d_6 , TFA) фурахіноцину L.

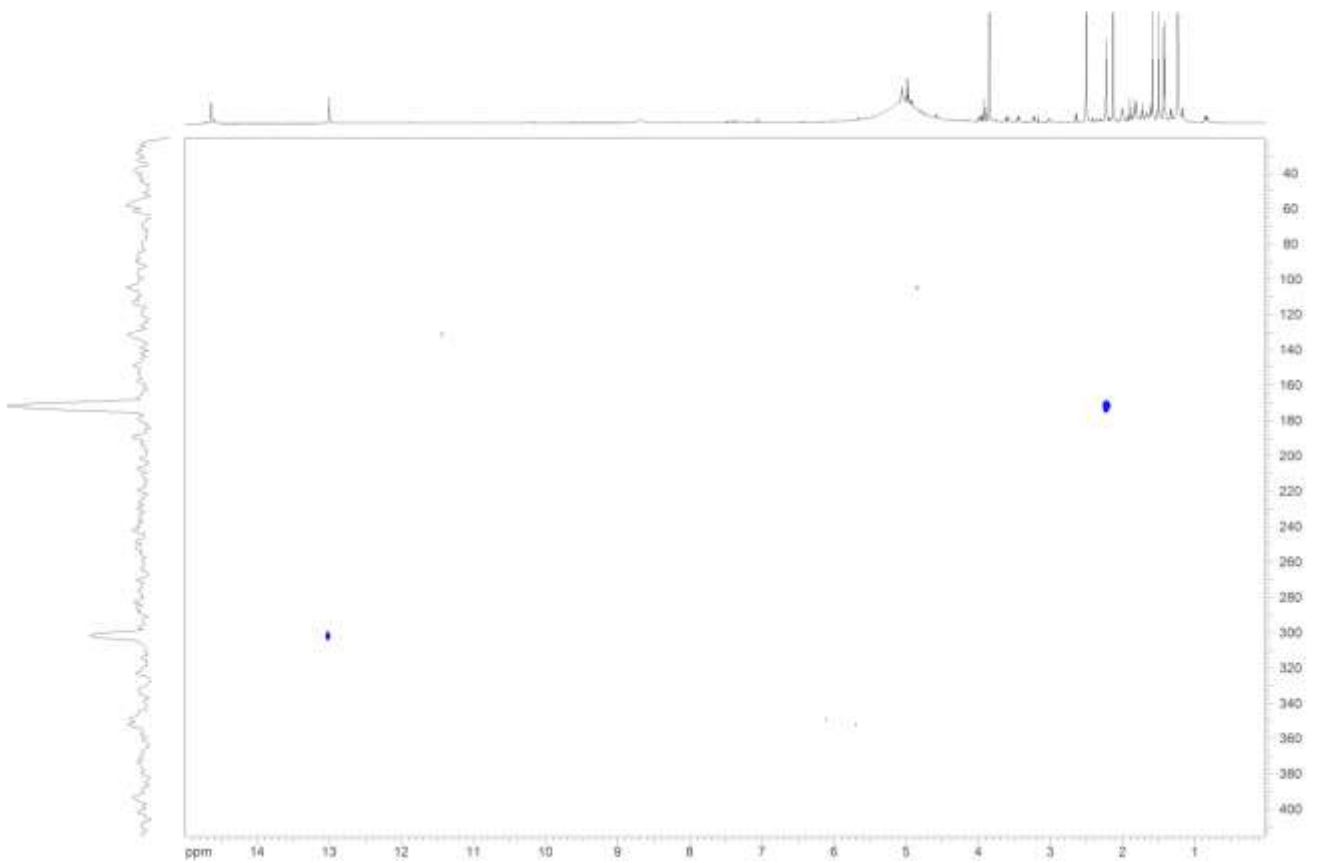


Рис. Д14. ^1H , ^{15}N -HMBC спектр (DMSO- d_6 , TFA) фурахіноцину L.