

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 579

НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ БОРРЕЛИДИНА *STREPTOMYCES ROCHEI* 3IZ-6 И ЕГО ПЕРСПЕКТИВЫ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

© 2023 г. И. Г. Широких^а, И. А. Остерман^{б, с}, Д. А. Лукьянов^{б, с}, В. И. Марина^{б, с},
М. В. Бирюков^б, О. А. Белозерова^д, Е. Б. Гугля^{д, е}, А. А. Широких^а, Я. И. Назарова^а,
Н. А. Боков^а, Ю. В. Закалюкина^{б, *}

^аФедеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого,
ул. Ленина, 166а, Киров, 610007 Россия

^бМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

^сСколковский институт науки и технологий,
Большой бульвар, 30, стр. 1, Москва, 121205 Россия

^дИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997 Россия

^еРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
ул. Островитянова, 1, Москва, 117997 Россия

*e-mail: juline@soil.msu.ru

Поступила в редакцию 24.08.2022 г.

После доработки 10.01.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2023 г.

Почвенные актиномицеты выделяли из верхнего горизонта грумусоли (Vertisols) на западном берегу оз. Кинерет в окрестности г. Тверия (Нижняя Галилея, Израиль). Проверка антибиотической активности 26 природных изолятов рода *Streptomyces* с использованием высокопроизводительного скрининга на основе двойной репортерной системы позволила выявить актинобактериальный штамм 3IZ-6, обладающий способностью ингибировать синтез белка. Методами полифазной таксономии штамм 3IZ-6 отнесен к виду *Streptomyces rochei*. Активное вещество *S. rochei* 3IZ-6 выделяли и очищали при помощи гравитационной обращеннофазовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии. С помощью toe-print анализа и данных масс-спектрофотометрии продуцируемый антибиотик идентифицировали как боррелидин. При совместном культивировании на твердых средах штамм 3IZ-6 способен подавлять рост фитопатогенных микроорганизмов: *Fusarium solani*, *F. sambucinum*, *Botrytis cinerea*, а также карантинного объекта *Curtobacterium flaccumfaciens*. Установлено выраженное фитотоксическое действие культуральной жидкости 3IZ-6 на семена пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L). Штамм *Streptomyces rochei* 3IZ-6 может найти применение в биотехнологии как продуцент боррелидина — ценного природного соединения с широким спектром антибиотического действия, в частности, как агент биоконтроля для защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенов и сорняков.

Ключевые слова: Vertisols, почвенные стрептомицеты, антибиотический скрининг, антифитопатогенное действие

DOI: 10.31857/S0032180X22601050, **EDN:** IECJXE

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность изучения актиномицетных сообществ в почвах различных биоклиматических зон и географических областей обусловлена в первую очередь широкомасштабным биотехнологическим использованием актиномицетов. С тех пор как З. Ваксман выделил из почвы штамм *Streptomyces griseus* (продуцента первого противотуберкулезного антибиотика стрептомицина), именно почвенные представители филума Actinomycetota стали предметом пристального внимания исследователей. Несмотря на то, что к настоящему вре-

мени выделено и описано около трех тысяч биологически активных молекул, продуцируемых стрептомицетами [25], потребность в обнаружении новых или уточнении природы открытых противомикробных соединений остается актуальной.

Наряду с исключительным среди других прокаринот потенциалом антибиотического действия, актиномицеты играют важную роль в биогеохимическом круговороте, в процессах формирования и развития почв. Известно, что абсолютное и относительное обилие актиномицетов увеличи-

ваются при переходе от почв холодного гумидного климата к почвам более южных и засушливых областей [2]. В современной литературе представлена информация об актиномицетных комплексах почв отдельных регионов с различным сочетанием факторов почвообразования, однако сведения об актинобиоте и ее антибиотическом потенциале в почвах, сформированных в условиях средиземноморской влажностной пульсации, недостаточно.

Оз. Кинерет находится на северо-востоке Израиля, в Иорданской рифтовой долине — одном из самых низких на Земле участков суши. Побережье озера расположено ниже уровня моря на 209–215 м [3]. Несмотря на сравнительно высокую минерализацию (содержание хлоридов около 300 мг/л), воды озера пригодны для питья, а само озеро служит крупнейшим резервуаром пресной воды в регионе [4].

Климат побережья оз. Кинерет — субтропический средиземноморский, с продолжительным жарким засушливым летом и прохладной дождливой зимой. Территория относится к средиземноморской флористической области. Естественная растительность состоит из однолетних и многолетних трав (*Oryzopsis* sp., *Avena sterilis*, *Hordeum bulbosum*) и одиноко стоящих деревьев (*Prunus amygdalus*, *Pistacia atlantica*). Расширение сельскохозяйственных угодий и систем орошения вокруг озера привело к почти полному исчезновению естественной растительности [18, 28].

Почвенный покров побережья представлен широким спектром почв, сменяющих друг друга на очень малых расстояниях — в пределах нескольких метров. Почвообразующими породами служат рыхлые коры выветривания базальтов и базальтовых туфов с большим количеством тяжелого по гранулометрическому составу мелкозема [6]. Наиболее характерными для данной территории являются рендзины (*Rendzinas*), протогрумусоли (*Cambisols*, *Lithosols*) и грумусоли (*Vertisols*) [34]. Последние относятся к наиболее распространенным в этой сложной почвенной мозаике [28].

В настоящей работе представлены результаты исследования состава и антибиотического потенциала актиномицетного комплекса грумусоли и характеристика выделенного из этой почвы нового продуцента ценного антибиотика — боррелидина.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Отбор образцов и выделение актиномицетов. Образцы для исследования отбирали из верхнего слоя (0–10 см) темной слитой трещиноватой глинистой почвы, соответствующей описанию грумусолей [6], согласно мировой коррелятивной базе почвенных ресурсов WRB, *Vertisols*.

Отбор проводили в феврале 2018 г. под злаковым разнотравьем на окраине г. Тверия, расположенного на западном берегу оз. Кинерет (32°46'43" N, 35°31'36" E) (рис. S1). Анализировали три смешанных образца, каждый из которых составляли объединением пяти индивидуальных проб, отобранных на площади 100 м². Актинобактерии выделяли при поверхностном посеве из разведений почвенных суспензий на казеин-глицериновый агар и среду с пропионатом натрия [9]. В качестве селективного приема почву перед посевом прогревали при 100°C в течение 1 ч. После инкубации (28°C, 21 сут) отбирали выросшие колонии мицелиальных прокариот, объединяя их в отдельные морфотипы, согласно общности культуральных и морфологических признаков. Чистоту выделенных культур определяли общепринятыми методами: микроскопически и высевом на агаризованную минеральную среду Гаузе 1 [1]. Отобранные штаммы поддерживали на скошенном овсяном агаре при +4°C, а при длительном хранении — в виде споровых суспензий в 20% глицероле при –80°C.

Скрининг антибиотической активности. Скрининг выделенных штаммов на антибиотическую активность проводили с использованием репортерной флуоресцентной системы на основе штамма *Escherichia coli* JW5503 ΔtolC с внедренной плазмидой pDualrep2, которая позволяет одновременно с классическим тестом на эффективность ингибирования роста определять механизм действия антибиотика [23]. Выделенные из посева актиномицеты выращивали в течение 10 сут на овсяном агаре, затем из агара с культурами вырезали блоки диаметром 5 мм и помещали их на плотную среду Luria Bennet, предварительно засеянную репортерным штаммом. В присутствии ингибиторов синтеза белка или молекул, нарушающих репликацию ДНК, репортерный штамм после инкубации (37°C, 18 ч) способен вырабатывать флуоресцентные белки RFP и Katushka2S, которые визуализируются в сканере ChemiDoc (Bio-Rad) в каналах Cy-3 и Cy-5 соответственно.

Установление химической природы активного вещества. Экстракция и очистка активного вещества. Штамм 31Z-6, отобранный при первичном антибиотическом скрининге, выращивали в погруженной культуре (30°C, 10 сут) на шейкере (2000 об./мин) в среде состава (г/л): мальтоза — 10, пептон — 10, гидролизат казеина — 2, дрожжевой экстракт — 2, NaCl — 6. Освобожденную от клеток культуральную жидкость (**КЖ**) наносили на хроматографическую колонку Poly-Prep Columns (Bio-Rad) с сорбентом LPS-500H (Техносорбент) и затем элюировали в градиенте вода-ацетонитрил (v/v). С помощью скрининга на репортерной системе выявляли активную фракцию. Разделение, очистку и идентификацию целевого вещества осуществляли методами высокоэффектив-

ной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии как описано ранее [30].

Изучение механизма действия активного вещества. Активную фракцию, полученную методом твердофазной экстракции КЖ штамма 3IZ-6, концентрировали на вакуумном испарителе (SpeedVac®) и использовали для определения минимальной ингибирующей концентрации в отношении репортерного штамма *E. coli* JW5503 ΔtolC pDualrep2 [26].

Эту фракцию использовали в toe-print анализе [22] и для изучения трансляции *in vitro* [7] с помощью готового набора *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates (Promega) согласно инструкции производителя. Трансляцию проводили в течение 30 мин при 37°C, кинетику реакции детектировали на приборе Victor X5 2030 (Perkin Elmer): каждую точку измеряли 30 раз, интервал между раундами измерения составлял 30 с.

Полифазная идентификация штамма-продуцента. **Описание культуральных и морфологических признаков.** Культуральные признаки штамма 3IZ-6 учитывали после 21-дневной инкубации при 28°C на мальтозо-дрожжевом (ISP 2), овсяном (ISP 3), крахмало-нитратном (ISP 4), глицерол-аспарагиновом (ISP 5), пептонно-дрожжевом агаре с железом (ISP 6) и тирозинном агаре (ISP 7) [27]. Окраску воздушного и субстратного мицелия оценивали по шкале RAL CLASSIC® и сопоставляли с аналогичными данными, приведенными для близких штаммов в базе BacDive (<https://bacdive.dsmz.de/>).

Форму цепочек и орнаментации поверхности спор изучали с помощью светового (Fisherbrand AX-502, Thermo Fisher Scientific) и сканирующего электронного микроскопа (Camscan-S2).

Определение физиологических особенностей. Рост штамма 3IZ-6 при различных температурах (от 4 до 50°C), в диапазоне pH (от 4 до 11 ед.) и при различных концентрациях NaCl (1, 2.5, 5, 6 и 7.5%) оценивали на среде Гаузе 1 после инкубации в течение 8 сут.

Утилизацию природных полимеров, а также способность образовывать кислоту при росте на среде с различными источниками углерода (рис. S2) оценивали как описано ранее [32, 33].

Для оценки чувствительности штамма 3IZ-6 к различным антибиотикам использовали диски индикаторные ДИ-ПЛС-50-01 по ТУ 9398-001-39484474-2000 (НИЦФ, Россия).

Филогенетический анализ последовательностей гена 16S рРНК. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК штамма 3IZ-6 проводили с использованием универсальных бактериальных праймеров 16SF75 (5'-AGTGGCGGACGGGTGAGTAA-3') и 16SR1100 (5'-TTACTAGCGATTCCGACTTCA-3'). Полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) выполняли при следующих условиях: начальная денатура-

ция при 95°C в течение 4 мин, далее 32 цикла (94°C в течение 20 с, 58°C в течение 30 с и 72°C в течение 45 с), после чего окончательное удлинение при 68°C в течение 5 мин. Продукты ПЦР секвенировали на анализаторе ДНК ABI3130xl (Thermo Fisher Scientific, USA) в НПК "Синтол" (Россия).

Прямые и обратные прочтения целевого фрагмента редактировали и собирали с помощью программы GeneStudio software Version 2.2.0.0. Итоговую последовательность 16S рРНК депонировали в GenBank (OK412986) (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>) и использовали для сравнительного филогенетического анализа с родственными типовыми штаммами стрептомицетов в программе MEGA software Version X (<https://www.megasoftware.net>). Для построения филограммы применяли методы присоединения соседей (Neighbor Joining, NJ) и максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) для 1000 альтернативных деревьев. Эволюционные дистанции между последовательностями рассчитывали с помощью модели Тамуры-Ней (Tamura-Nei's model).

Анализ ингибиторной активности штамма-продуцента против возбудителей болезней растений. Для оценки способности штамма 3IZ-6 угнетать развитие фитопатогенных микроорганизмов использовали штаммы из Всероссийской коллекции микроорганизмов (Пушино) и рабочей коллекции лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов ФАНЦ Северо-Востока (Киров) (табл. 1). Для роста тест-культур бактерий и оценки методом агаровых блоков антибактериальной активности штамма использовали среду RHM [10]. Культивирование фитопатогенных грибов и оценку их способности расти в присутствии штамма 3IZ-6 проводили на картофельно-декстрозном агаре [8] при 25°C в течение 10–12 сут.

Оценка фитотоксичности штамма 3IZ-6. Для оценки возможной фитотоксичности и выделения активного вещества штамм 3IZ-6 культивировали как описано выше. Семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) замачивали в нативной и разбавленной водой КЖ стрептомицета (1 : 10) на 20 ч и проращивали в рулонной водно-бумажной культуре (20°C, 5 сут), при фотопериоде 16 ч и освещенности 7 кЛк. В контроле семена замачивали в воде. В каждом варианте опыта закладывали в рулоны по 100 семян. Учитывали всхожесть, линейные размеры и воздушно-сухую биомассу проростков. Статистическую обработку данных выполняли стандартными методами с использованием пакета Microsoft Excel 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая численность актиномицетов в образцах исследуемой почвы составила 10^5 – 10^6 колоние-

Таблица 1. Возбудители болезней растений, использованные для оценки антифитопатогенной активности

Микроорганизм	Коллекция, номер штамма	Возбудитель [5]
<i>Fusarium sambucinum</i>	ВКМ F-842	Сухая гниль клубней картофеля
<i>Botrytis cinerea</i>	ВКМ F-4549	Серая гниль томата, перца, кабачка, салата, земляники и др.
<i>Rhizoctonia solani</i>	ВКМ F-2935	Ризоктониоз, стеблевой ожог фасоли
<i>Fusarium oxysporum</i>	ВКМ F-137	Фузариоз фасоли, гороха, фузариозное увядание люпина, фузариозная гниль томата, лука-порея, тыквенных культур
<i>Cercospora carotae</i>	ВКМ F-2164	Церкоспороз моркови
<i>Alternaria solani</i>	ВКМ F-3048	Альтернариозная (бурая) пятнистость томата и баклажана
<i>Fusarium solani</i>	ВКМ F-819	Фузариозная гниль томата и фузариозное увядание тыквенных культур, фузариоз гороха
<i>Oospora pustulans</i> (<i>Polyscytalum pustulans</i>)	ВКМ F-886	Парша бугорчатая, или ооспороз картофеля
<i>Alternaria radicina</i>	ВКМ F-1863	Черная гниль сельдерейных (зонтичных) культур
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	ФАНЦ- G29г4	Бактериальное увядание зернобобовых культур (фасоль, горох, соя, маш и др.)
<i>Bacillus aryabhattai</i>	ФАНЦ- G11г3	Нет
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	ФАНЦ-ША	Гельминтоспориозная корневая гниль зерновых культур, темно-бурая пятнистость ячменя
<i>Fusarium proliferatum</i>	ФАНЦ-ТЖ	Болезни многих видов растений, преимущественно в теплицах
<i>F. culmorum</i>	ФАНЦ-Т-8	Фузариоз злаков, корневая гниль многих видов растений
<i>F. oxysporum</i>	ФАНЦ-ШТ	Фузариоз фасоли, гороха, фузариозное увядание люпина, корневая гниль многих видов растений
<i>Alternaria alternata</i>	ФАНЦ-ША	Пятнистость томата, оливковая плесень злаков
<i>Trichoderma</i> sp.	ФАНЦ-ВК	Нет

образующих единиц/г, вне зависимости от используемой среды. Актиномицетный комплекс грумуселей включал представителей родов *Streptomyces* и олигоспоровые формы, которые разграничивали на основе характерных морфологических признаков: образование нефрагментирующегося мицелия, наличие спор на воздушном и/или субстратном мицелии, величина и количество спор в цепочках [12].

По частоте встречаемости (84%) и долевого участию (94.6%) в комплексе мицелиальных прокариот доминировали представители рода *Streptomyces*, что согласуется со многими литературными данными [2]. Олигоспоровые формы актиномицетов встречались с гораздо меньшей частотой (33%). Особенностью стрептомицетного комплекса грумуселей явилось доминирование видов, образующих различные пигменты (представителей секций и серий) [1]: *Cinereus Violaceus* (40%), *Helvolum Flavus Helvolum* (20%) и небольшая доля неокрашенных видов: серии *Cinereus Achromogenes* (11.7%), что очевидно связано с необходимостью защиты клеток стрептомицетов от интенсивной инсоляции.

Для антибиотического скрининга отобрали 26 фенотипически различных стрептомицетов, которые наращивали в погруженных культурах и затем тестировали с помощью двойной репортерной системы. Изолят 3IZ-6 не только ингибировал рост штамма *E. coli* ΔtolC JW5503, трансформированного плазмидой pDualrep2, но и инициировал образование им флуоресцентного белка, что свидетельствует о наличии в КЖ штамма 3IZ-6 ингибиторов синтеза белка (рис. S3). Поэтому дальнейшая работа была сфокусирована на изучении данного изолята и синтезируемого им метаболита.

При помощи твердофазной экстракции КЖ штамма 3IZ-6 разделили на отдельные ацетонитриловые фракции. Наибольшей антибиотической активностью в отношении репортерной системы *E. coli* ΔtolC JW5503 pDualrep2 обладала фракция, полученная экстракцией 50%-ным раствором ацетонитрила в воде. Постановка реакции синтеза белка в бесклеточной системе показала, что выделенный образец подавляет синтез белка при содержании ниже минимальной ингибирующей концентрации (рис. S4), что позволяет рассматривать аппарат синтеза белка как его основную ми-

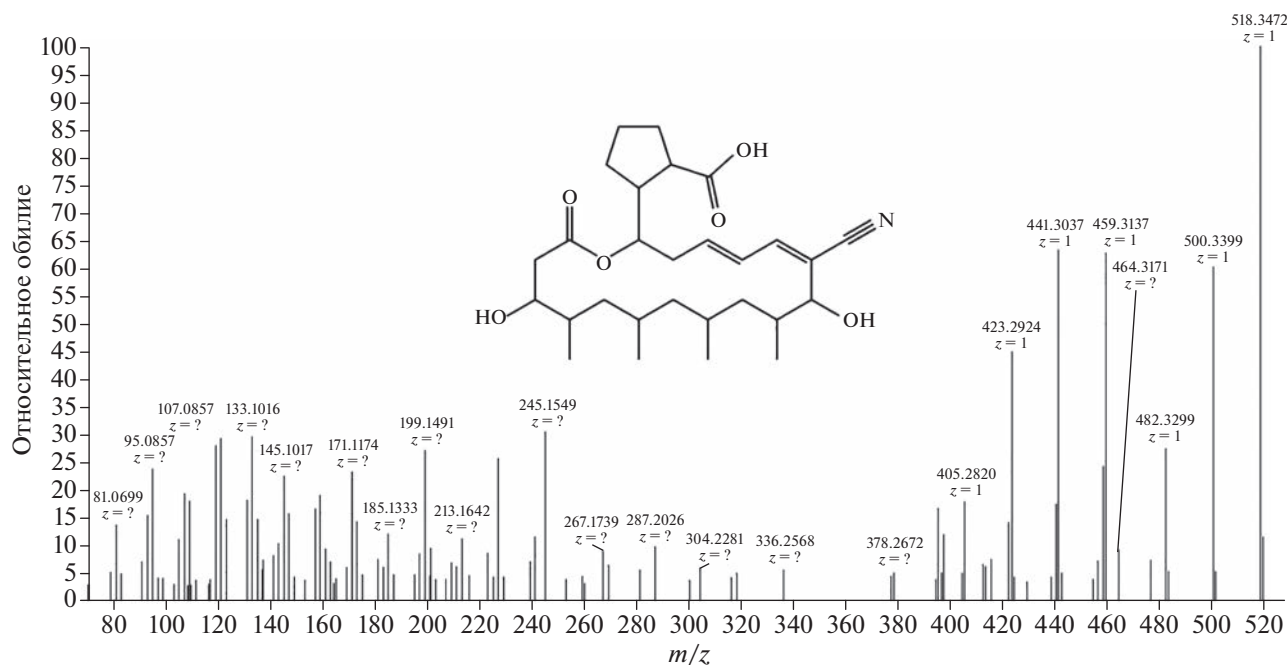


Рис. 1. Структура молекулы боррелидина ($C_{28}H_{43}NO_6$, молекулярная масса 489.6 г/моль) и спектр MS2.

шень. Разведения 1 : 10 и 1 : 100 активной фракции штамма 3IZ-6 полностью подавляют *in vitro* трансляцию, как и положительный контроль — 50 мкг/мл эритромицина.

Поскольку метаболит, образуемый штаммом 3IZ-6, оказал однозначное влияние на процесс биосинтеза белка, его было решено протестировать с помощью toe-print анализа для выявления стадии трансляции, на которую он воздействует (рис. S5). Остановка рибосомы произошла на треониневом кодоне в А-сайте рибосомы. Такую активность может демонстрировать известный ингибитор треонил-тРНК-синтазы — боррелидин [19]. Присутствие боррелидина в образце 3IZ-6 подтверждено при помощи масс-спектрометрии (рис. 1).

Боррелидин — уникальный по структуре 18-членный нитрилсодержащий поликетидный макролактон с антибактериальной [11], антимикотической [15], антималярийной [24] и противовирусной активностью [20]. Боррелидин может воздействовать на раковые клетки, благодаря способности подавлять ангиогенез [21], индуцировать апоптоз и ингибировать треонил-тРНК-синтазу [16]. Несмотря на широкий потенциал клинического действия, боррелидин пока не нашел широкого применения в медицинской практике из-за цитотоксичности в отношении здоровых клеток.

Для установления таксономического положения штамма 3IZ-6 использовали полифазный таксономический подход, включающий анализ комплекса как генетических, так и фенотипиче-

ских признаков. Сравнение нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК штамма 3IZ-6 с последовательностями типовых представителей видов рода *Streptomyces* из базы данных GenBank выявило, что ближайшими видами со 100% сходством являются *S. rochei* DSM 40231^T и *S. mutabilis* DSM 40169^T. На филогенетическом древе они образуют вместе с 3IZ-6 отдельную кладу с высоким уровнем бутстрап-поддержки (рис. 2). По морфологическим и физиолого-биохимическим признакам эти виды очень близки, поэтому для их разграничения необходим полногеномный анализ. По культуральным признакам (цвету и текстуре воздушного мицелия на ISP-средах) штамм 3IZ-6 ближе к типовому *S. rochei* DSM 40231^T (табл. 2, рис. 3). Среди представителей вида *S. rochei* продуценты боррелидина обнаруживались неоднократно [11, 29, 31], есть данные о получении ацетилборрелидина В из культуры *S. mutabilis* [17]. Способность к синтезу данного антибиотика не ограничена строго определенным таксоном. Среди продуцентов боррелидина встречаются представители родов *Streptomyces* и *Nocardioopsis*, изолированные из различных местобитаний, включая эконишы с повышенной соленостью: океанические осадки, морские моллюски, мангровые отложения, засоленные почвы [10, 11, 18, 20, 23]. Предполагаем, что выделенный из грумисолей побережья оз. Кинерет продуцент боррелидина 3IZ-6 принадлежит к виду *S. rochei*.

Ранее отмечено, что боррелидин может быть использован в защите растений для борьбы с *Phy-*

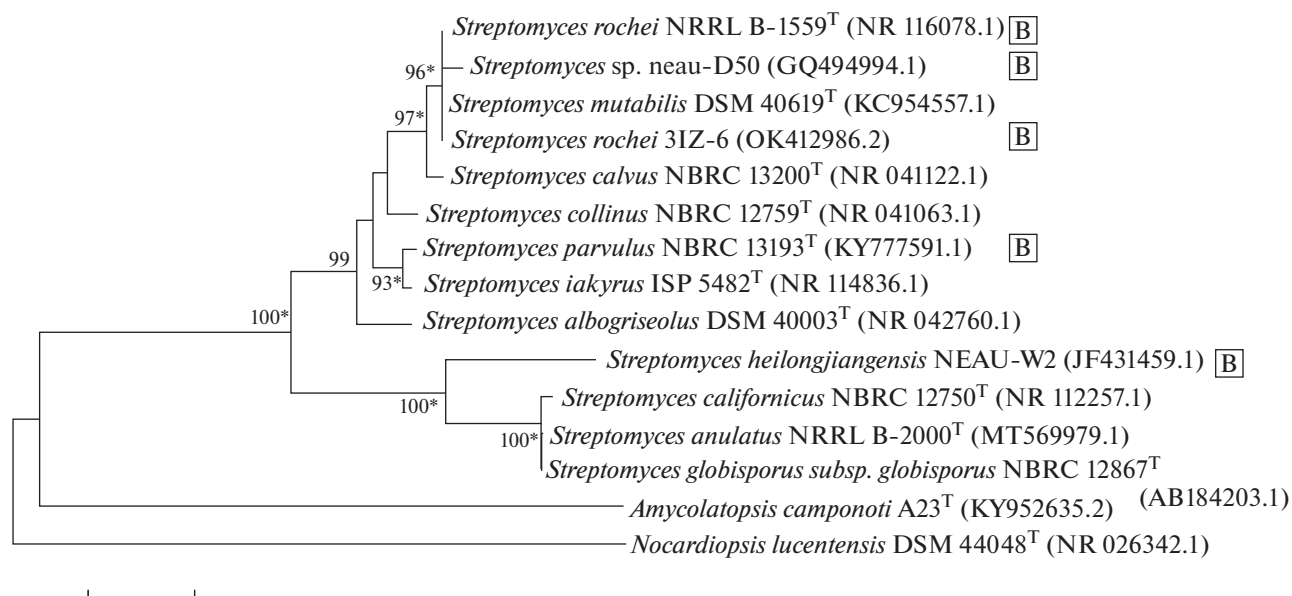


Рис. 2. Филогенетическое положение штамма 3IZ-6 и наиболее близких ему генетически типовых штаммов стрептомицетов, на основании NJ-анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рПНК (в скобках указаны номера доступа последовательностей в GenBank). Указаны значения бутстрэп-анализа выше 60%. Масштаб соответствует одной замене на каждые 100 нуклеотидов. Знаком (*) отмечены ветви, также полученные с помощью ML-метода. Штамм *Nocardioopsis lucentensis* DSM 44048 выбран как референсный организм, не принадлежащий к роду *Streptomyces*. Штаммы, у которых показана способность продуцировать боррелидин, отмечены **В**.

tophthora sojae — возбудителем фитофтороза и стеблевой гнили сои (*Glycine max*) [15], а также против грибов *Pythium* sp. и *Phytophthora* sp., поражающих ряд важных сельскохозяйственных культур [14]. Результаты настоящих исследований показали способность штамма *S. rochei* 3IZ-6 подавлять рост почвообитающих фитопатогенных грибов *Fusarium solani*, *F. sambucinum*, *Botrytis cinerea* (рис. S6), вызывающих болезни у многих хозяйственно ценных видов растений.

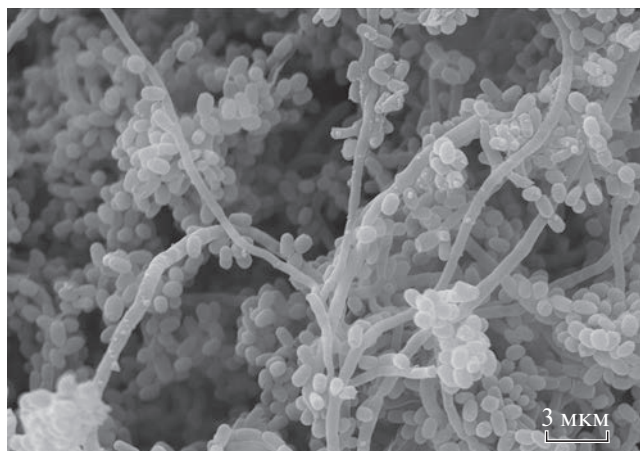


Рис. 3. Электронная микрофотография штамма 3IZ-6 на среде ISP 3 на 14 сут инкубации при 28°C.

В отношении фитопатогенов *Bipolaris sorokiniana*, *F. proliferatum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *Alternaria alternata* не выявлено угнетающего действия агаровых блоков с культурой *S. rochei* 3IZ-6, но отмечено умеренное угнетение роста сапротрофного гриба *Trichoderma* sp. (13 мм). Установлено, что *S. rochei* 3IZ-6 способен подавлять рост некоторых фитопатогенных бактерий. Наиболее значительным было угнетение роста *Curtobacterium flaccumfaciens* G29r4 (40 мм). Данный фитопатоген может вызывать бактериальное увядание фасоли (*Phaseolus* spp.), гороха (*Pisum sativum*), сои и некоторых других бобовых культур. Рядом международных комиссий по карантину и защите растений возбудитель *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* включен в число карантинных объектов (<https://www.eppo.int>).

Фитотоксичность боррелидина впервые отмечена у *S. scabies*, но его угнетающее действие было на порядок ниже, чем такстомина А [13]. Оценка фитотоксического действия *S. rochei* 3IZ-6 показала, что водорастворимые метаболиты изолята снижают всхожесть обработанных семян пшеницы на 15, длину корней проростков — на 52, высоту побега — на 46, биомассу — на 48% по сравнению с растениями, не подвергнутыми обработке (табл. 3). Поскольку степень фитотоксичности *S. rochei* 3IZ-6 варьировала в зависимости от условий культивирования и состава питательной среды, теоретически представляется возможным подо-

Таблица 2. Культуральные, морфологические и физиологические признаки штамма 3IZ-6 и филогенетически близких видов стрептомицетов

Фенотипический признак	3IZ-6	<i>S. rochei</i> DSM 40231 ^T	<i>S. mutabilis</i> DSM 40169 ^T
Культуральные			
Цвет воздушного мицелия*	Серый*	Серый*	Светло-серый**
Цвет субстратного мицелия**	Бесцветный*	От бесцветного до серо-бурого	От желтовато-зеленого до серовато-фиолетового
Образование меланоидного пигмента**	Не образует	Не образует	Не образует
Морфологические			
Форма цепочек спор	Крючки, петли, короткие спирали (RA)***	Спиральные (S)	Крючки, петли, короткие спирали (RA)
Поверхность спор	Гладкая	Гладкая	Гладкая
Физиологические			
Максимальная концентрация NaCl, %	6	5	8
Диапазон pH	5–9	Нет	6–10
Диапазон температур, °C	4–45	Нет	25–40
Оптимальная температура, °C	38	30	37
Биохимические			
Гидролиз казеина	+	Нет	+
Гидролиз крахмала	+	Нет	+
Гидролиз КМЦ	+	Нет	Нет
Утилизирует углеводы	Арабиноза, галактоза, глюкоза, лактоза, мальтоза, маннит, манноза, рамноза, фруктоза	Глюкоза, рамноза, фруктоза	Арабиноза, глюкоза, маннитол, рамноза
Не использует углеводы	Инозитол, ксилоза, раффиноза, сахароза, сорбитол	Арабиноза, раффиноза, сахароза, ксилоза	Сорбитол
Чувствителен к антибиотикам, мкг	Str (300), Carb (25), Kan (30), Tet (30), PB (300)	Нет	Нет
Устойчив к антибиотикам, мкг	Ctx (30), Amx (20), Rif (5)****	Нет	Нет

* На плотных средах ISP 2–ISP 5.

** На ISP 6.

*** Форма спороносных гиф описана на ISP 3 на 14 сут роста при 28°C (рис. 3).

**** Str (стрептомицин), Carb (карбенициллин), Kan (канамицин), Tet (тетрациклин), PB (полимиксин В), Ctx (цефотаксим), Amx (амоксиклав), Rif (рифампицин).

Таблица 3. Всхожесть и морфометрические показатели проростков в зависимости от обработки семян КЖ *S. rochei* 3IZ-6

Вариант		Длина корня, мм	Высота побега, мм	Биомасса в.-с., г	Всхожесть, %
Контроль (без обработки)		89.78 ± 8.83*	35.5 ± 4.13	0.25 ± 0.01	87 ± 3.83
КЖ, полученная на ISP 3	Нативная	43.13 ± 4.03**	19.07 ± 3.04**	0.13 ± 0.01**	72 ± 5.66**
	1 : 10	69.13 ± 7.56**	29.48 ± 3.76	0.21 ± 0.03**	84 ± 5.66
КЖ, полученная на среде Гаузе 1	Нативная	71.88 ± 7.03**	32.15 ± 3.28	0.20 ± 0.02**	87 ± 6.0
	1 : 10	94.16 ± 10.28	45.04 ± 6.88	0.26 ± 0.02	93 ± 3.83

 * Указаны средние значения и их стандартные отклонения (после знака ±), объем выборки $n = 100$.

 ** Различия с контролем достоверно при $p \geq 0.95$.

брать оптимальные параметры, обеспечивающие желаемую гербицидную активность данной культуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из грумусолей, сформированных в специфических условиях, связанных с закономерным сезонным чередованием продолжительных сухих и коротких влажных периодов, с использованием селективного приема получено 26 изолятов бактерий рода *Streptomyces*. В результате проведения антибиотического скрининга выделенных культур стрептомицетов выявлен штамм *S. rochei* 3IZ-6, содержащий, по данным репортерной флуоресцентной системы, ингибитор белкового синтеза, который с помощью постановки реакции *in vitro* трансляции, toe-print анализа и масс-спектрометрии идентифицирован как боррелидин. Антибиотик боррелидин и его дериваты в настоящее время интенсивно изучаются в связи с разработкой новых противораковых средств. Особый интерес представляет способность боррелидина ингибировать активность фермента треонил-тРНК-синтазы, принимающего участие в синтезе белка. Исследования почвенного изолята *S. rochei* 3IZ-6 в качестве нового продуцента боррелидина является приоритетным направлением.

Вместе с тем в чистых культурах *S. rochei* 3IZ-6 продемонстрировал угнетающее действие в отношении почвообитающих фитопатогенных грибов *F. solani*, *F. sambucinum*, *B. cinerea* и бактерии *C. flaccumfaciens*, имеющих широких круг растений-хозяев из числа сельскохозяйственных культур. Так, перечисленные возбудители отличаются высокой вредоносностью в отношении зернобобовых, тыквенных, томата, перца и ряда других овощных и полевых культур, возделываемых в разнообразных почвенных условиях.

Наряду с антифитопатогенным действием, в лабораторных условиях установлена выраженная фитотоксичность водорастворимых метаболитов *S. rochei* 3IZ-6, в связи с чем целесообразно проведение исследований, связанных с разработкой на его основе препарата гербицидного действия. Представленные в работе данные свидетельствуют о перспективности использования выделенного из грумусоли побережья оз. Кинерет изолята в защите растений от фитопатогенов и сорняков.

БЛАГОДАРНОСТЬ

И.Г. Широких, А.А. Широких, Я.И. Назарова, Н.А. Боков благодарят ФГБНУ Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого за поддержку в рамках осуществления государственного задания № FNWE-2022-0005.

Ю.В. Закалюкина благодарит Министерство науки и высшего образования Российской Федерации за поддержку в рамках проекта № 075-15-2021-1396.

Исследование ультраструктуры поверхности штамма 3IZ-6 проведено в общефакультетской лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00278.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Рис. S1. Место отбора проб на западном берегу оз. Кинерет (Нижняя Галилея, Израиль) под злаковым разнотравьем.

Рис. S2. Способность штамма 3IZ-6 образовывать кислоту при росте на среде с различными источниками углерода.

Рис. S3. Индукция двойной репортерной системы, чувствительной к ингибиторам синтеза белка или репликации ДНК.

Рис. S4. *In vitro* трансляция в системе на основе лизата *E. coli* (Promega).

Рис. S5. Схема toe-print анализа на матрице RST1.

Рис. S6. Рост фитопатогенных грибов отдельно и в присутствии штамма *S. rochei* 3IZ-6: *Fusarium solani* F-819, *Botrytis cinerea* F-4549, *Fusarium sambucinum* F-842, *Alternaria radicina* F-1843, *Alternaria solani* F-3048, *Rhizoctonia solani* F-2935 (картофельно-декстрозный агар, 10 сут).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов: роды *Streptomyces*, *Streptovorticillium*, *Chainia*. М.: Наука, 1983. 248 с.
2. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. М.: ГЕОС, 2001. 256 с.
3. Кожевникова И.А., Швейкина В.И. Моделирование колебаний уровня озера Кинерет // Водные ресурсы. 2014. Т. 41. № 6. С. 565–572.
4. Озиранский Ю.С., Кольмакова Е.Г., Марголина И.Л. Интегрированное управление ограниченными водными ресурсами в целях устойчивого водообеспечения аридных регионов (опыт государства Израиль // Аридные экосистемы. 2014. Т. 20. № 4(61). С. 57–65.
5. Станчева Й. Атлас болезней сельскохозяйственных культур. София-М.: Пенсофт, 2005. 175 с.
6. Шапиро М.Б. Почвы Израиля // Почвоведение. 2006. № 11. С. 1300–1307.

7. *Alferova V.A., Maviza T.P., Biryukov M.V., Zakalyukina Y.V., Lukianov D.A., Skvortsov D.A., Osterman I.A.* Biological evaluation and spectral characterization of a novel tetracenomycin X congener // *Biochimie*. 2022. V. 192. P. 63–71.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.09.014>
8. *Atlas R.M.* Handbook of microbiological media. CRC Press, 2004. 2056 p.
9. *Baranova A.A., Chistov A.A., Tyurin A.P., Prokhorenko I.A., Korshun V.A., Biryukov M.V., Zakalyukina Y.V.* Chemical ecology of streptomyces albidoflavus strain a10 associated with carpenter ant camponotus vagus // *Microorganisms*. 2020. V. 8. № 12. P. 1948.
10. *Belimov A.A., Dietz K.-J.* Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations // *Microbiol. Res.* 2000. V. 155. № 2. P. 113–121.
[https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80046-4](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80046-4)
11. *Berger J., Jampolsky L.M., Goldberg M.W.* Borrelidin, a new antibiotic with antiborrelia activity and penicillin enhancement properties // *Arch. Biochem.* 1949. V. 22. № 3. P. 476–478.
12. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. V. 5. The Actinobacteria. Part A. / Eds. M. Goodfellow et al. N.Y.: Springer, 2012. 2083 p.
13. *Cao Z., Khodakaramian G., Arakawa K., Kinashi H.* Isolation of borrelidin as a phytotoxic compound from a potato pathogenic *Streptomyces* strain // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012. V. 76. № 2. P. 353–357.
<https://doi.org/10.1271/bbb.110799>
14. *Chen Y.-Y., Chen P.-C., Tsay T.-T.* The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsici* // *Biol. Control*. 2016. V. 98. C. 34–42.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.011>
15. *Gao Y.-M., Gao Y.M., Wang X.J., Zhang J., Li M., Liu C.X., An J., Xiang W. S.* Borrelidin, a potent antifungal agent: insight into the antifungal mechanism against *Phytophthora sojae* // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. № 39. P. 9874–9881.
<https://doi.org/10.1021/jf302857x>
16. *Habibi D., Ogloff N., Jalili R. B., Yost A., Weng A.P., Ghahar, A., Ong C.J.* Borrelidin, a small molecule nitrile-containing macrolide inhibitor of threonyl-tRNA synthetase, is a potent inducer of apoptosis in acute lymphoblastic leukemia // *Invest New Drugs*. 2012. V. 30. № 4. P. 1361–1370.
<https://doi.org/10.1007/s10637-011-9700-y>
17. *Hamed A., Abdel-Razek A.S., Frese M., Wibberg D., El-Haddad A.F., Ibrahim T.M., Kalinowski J. et al.* N-Acetylborrelidin B: a new bioactive metabolite from *Streptomyces mutabilis* sp. MII // *Z Naturforsch C*. 2018. V. 73. № 1–2. P. 49–57.
<https://doi.org/10.1515/znc-2017-0140>
18. *Hazan N., Stein M., Agnon A., Marco S., Nadel D., Negendank J. F., Neev D.* The late Quaternary limnological history of Lake Kinneret (Sea of Galilee), Israel // *Quat. Res.* 2005. V. 63. № 1. P. 60–77.
<https://doi.org/10.1016/j.yqres.2004.09.004>
19. *Li M., Zhang J., Liu C., Fang B., Wang X., Xiang W.* Identification of borrelidin binding site on threonyl-tRNA synthetase // *BBRC*. 2014. V. 451. № 4. P. 485–490.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.100>
20. *Lumb M., Macey P.E., Spyvee J., Whitmarsh J.M., Wright R.D.* Isolation of Vivomycin and Borrelidin, Two Antibiotics with Anti-Viral Activity, from a Species of *Streptomyces* (C2989) // *Nature*. 1965. V. 206. № 4981. P. 263–265.
<https://doi.org/10.1038/206263a0>
21. *Olano C., Moss S.J., Braña A.F., Sheridan R.M., Math V., Weston A.J., Salas J.A.* Biosynthesis of the angiogenesis inhibitor borrelidin by *Streptomyces parvulus* Tü4055: insights into nitrile formation† // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 52. № 6. P. 1745–1756.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04090.x>
22. *Orelle C., Carlson S., Kaushal B., Almutairi M.M., Liu H., Ochabowicz A., Mankin A.S.* Tools for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 12. P. 5994–6004.
<http://aac.asm.org/content/57/12/5994>
23. *Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryayev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Dontsova O.A.* Sorting Out Antibiotics' Mechanisms of Action: a Double Fluorescent Protein Reporter for High-Throughput Screening of Ribosome and DNA Biosynthesis Inhibitors // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. № 12. P. 7481–7489.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02117-16>
24. *Otoguro K., Ui H., Ishiyama A., Kobayashi M., Togashi H., Takahashi Y., Masuma R. et al.* In Vitro and in Vivo Antimalarial Activities of a Non-glycosidic 18-Membered Macrolide Antibiotic, Borrelidin, against Drug-resistant Strains of Plasmodia // *J. Antibiot.* 2003. V. 56. № 8. P. 727–729.
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.56.727>
25. *Rai R.V., Bai J.A.* Natural Products from Actinomycetes: Diversity, Ecology and Drug Discovery. Mysore, Karnataka, India, 2022. 512 p.
<https://doi.org/10.1007/978-981-16-6132-7>
26. *Shiryaev D.I., Sofronova A.A., Berdnikov E.A., Lukyanov D.A., Komarova E.S., Marina V.I., Dontsova O.A.* Nybomycin inhibits both fluoroquinolone-sensitive and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* DNA gyrase // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2021. V. 65. № 5. P. e00777–20.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00777-20>
27. *Shirling E.B., Gottlieb D.* Methods for characterization of Streptomyces species // *Int. J. Syst. Bact.* 1966. V. 16. № 3. P. 313–340.
28. *Singer A.* The Soils of Israel. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007. 306 p.
<https://doi.org/10.1007/978-3-540-71734-8>
29. *Sun J., Shao J., Sun C., Song Y., Li Q., Lu L., Ju J.* Borrelidins F–I, cytotoxic and cell migration inhibiting agents from mangrove-derived *Streptomyces rochei* SCSIO ZJ89 // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26 № 8. P. 1488–1494.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.01.010>
30. *Volynkina I.A., Zakalyukina Y.V., Alferova V.A., Belik A.R., Yagoda D.K., Nikandrova A.A., Buyuklyan Y.A. et al.* Mechanism-Based Approach to New Antibiotic Producers Screening among Actinomycetes in the Course of the Citizen Science Project // *Antibiotics*. 2022. V. 9.

- № 11. P. 1198.
<https://doi.org/10.20944/preprints202208.0132.v1>
31. Yu M., Li Y., Banakar S. P., Liu L., Shao C., Li Z., Wang C. New metabolites from the co-culture of marine-derived actinomycete *Streptomyces rochei* MB037 and fungus *Rhinochrysiella similis* 35 // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 915.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00915>
 32. Zakalyukina Y.V., Osterman I.A., Wolf J., Neumann-Schaal M., Nouioua I., Biryukov M.V. *Amycolatopsis camponoti* sp. nov., new tetracenomycin-producing actinomycete isolated from carpenter ant *Camponotus vagus* // Antonie van Leeuwenhoek. 2022. V. 115. № 4. P. 533–544.
<https://doi.org/10.1007/s10482-022-01716-w>
 33. Zakalyukina Y.V., Zaytsev A.R., Biryukov M.V. Study of Cellulose-Destroying Activity of Actinobacteria Associated with Ants // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2021. V. 76. № 1. P. 20–27.
<https://doi.org/10.3103/S0096392521010065>
 34. European Soil Data Centre [Электронный ресурс]. URL: https://esdac.jrc.ec.europa.eu/images/Eudasm/Asia/images/maps/download/IL3002_SO.jpg

Biocontrol Potential of Novel Borrelidin-Producing *Streptomyces rochei* 3IZ-6 Isolated from Israeli Soil

I. G. Shirokikh¹, I. A. Osterman^{2, 3}, D. A. Lukianov^{2, 3}, V. I. Marina^{2, 3}, M. V. Biryukov²,
 O. A. Belozero⁴, E. B. Guglya^{4, 5}, A. A. Shirokikh¹, Ya. I. Nazarova¹,
 N. A. Bokov¹, and Yu. V. Zakalyukina^{2, *}

¹Rudnitsky Federal Agricultural Research Center of the North-East, Kirov, 610007 Russia

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

³Skolkovo Institute of Science and Technology, Center of Life Sciences, Moscow, 121205 Russia

⁴Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997 Russia

⁵Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: juline@soil.msu.ru

The soil actinobiota of various climatic zones are a rich source of bioactive natural products, including novel drugs. A complex of soil actinomycetes in the upper horizon of the grumusols (Vertisols) on the western coast of Lake Kinneret in the vicinity of Tiberias (Lower Galilee, Israel) was studied. The screening of the antagonistic activity of 26 isolates using on a dual reporter system revealed the bacterial strain 3IZ-6, which had the ability to inhibit protein synthesis. Strain 3IZ-6 was assigned to *Streptomyces rochei* by polyphase taxonomy approach. The active substance of *S. rochei* 3IZ-6 was isolated and purified using solid-phase extraction and HPLC. Toe-print analysis and mass spectrometry data allowed to establish, that active compound is a known inhibitor of protein biosynthesis, borrelidin. *S. rochei* 3IZ-6 can be used as a producer of borrelidin in biocontrol against phytopathogens and weeds.

Keywords: *Vertisols*, soil actinomycete, antibiotics screening, antiphytopathogen activity