

УДК 579.873.71+579.222+579.64

НОВЫЕ АГРОНОМИЧЕСКИ ЦЕННЫЕ ШТАММЫ РОДА *Streptomyces* И ИХ БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

© 2025 г. И. Г. Широких^{1, 2, *}, Н. А. Боков^{1, 2}, А. А. Алалыкин², А. А. Широких^{1, 2}

¹Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого, Киров, 610007 Россия

²Вятский государственный университет, Киров, 610000 Россия

*e-mail: irgenal@mail.ru

Поступила в редакцию 10.05.2024 г.

После доработки 07.08.2024 г.

Принята к публикации 05.09.2024 г.

Органическое земледелие — мировой тренд, благодаря которому увеличивается спрос на биологические препараты для использования в сельскохозяйственном производстве. В работе охарактеризованы новые штаммы актиномицетов, изолированные методом прямого посева из почвенных проб, отобранных в различных агроценозах Вятско-Камского Предуралья (Россия). В результате предварительного тестирования (около 350 штаммов) по признаку антифунгальной активности выделены изоляты 8A13, N27-25 и P15-2, идентифицированные по данным анализа 16S рРНК как бактерии рода *Streptomyces*. Активное вещество с антифунгальным эффектом — скопафунгин идентифицировано с использованием ВЭЖХ-МС/МС. Наряду с угнетающим действием на фитопатогенные грибы, эти штаммы продуцируют в присутствии 100 мкг/мл L-триптофана ауксины (17.4–20.8 мкг/мл), обладают целлюлолитической активностью и оказывают стимулирующее действие на всхожесть и накопление сухой биомассы проростками пшеницы, клевера и горчицы. Сделано заключение, что обладая комплексом полезных для растений характеристик, штаммы *Streptomyces* 8A13, N27-25 и P15-2 могут быть использованы в качестве кандидатных для создания биологических препаратов фунгицидного и фитостимулирующего действия.

Ключевые слова: стрептомицеты, биофунгициды, ростстимуляция, ауксины, целлюлаза, контроль фитопатогенов

DOI: 10.31857/S0555109925010096 EDN: DANXMX

Устойчивый спрос на биологические препараты для повышения урожайности и защиты растений от болезней и вредителей связан с мировым трендом на производство органической продукции сельского хозяйства [1]. В рамках органического земледелия запрещено использовать продукты химического синтеза. Отказ от химических пестицидов и удобрений в пользу природоподобных технологий повышает актуальность исследований, направленных на выделение и отбор микроорганизмов, способных контролировать численность фитопатогенов и способствовать росту продуктивности сельскохозяйственных культур.

Биоконтрольная и ростстимулирующая активность присуща многим почвенным бактериям, относящимся к различным таксономическим группам: *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*,

Burkholderia, *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Pantoea* и ряду других. Колонизируя корни, они оказывают благоприятное влияние на растения, благодаря таким свойствам как фиксация азота, фосфатмобилизация, продукция противомикробных метаболитов, фитогормонов, сидерофоров, синтез АЦК-деаминазы, что послужило основанием для их выделения в группу стимулирующих рост растений ризобактерий (plant growth-promoting rhizobacteria — PGPR) [2, 3].

Актиномицеты отличаются от других PGPR мицелиальный тип организации и связанная с этим высокая колонизирующая способность [4, 5], толерантность к временному дефициту питательных веществ, образование устойчивых к высушиванию и УФ облучению спор, широкий спектр гидролитических ферментов и, соответственно, способность

к утилизации широкого спектра труднодоступных для других бактерий природных полимеров, включая целлюлозу и гемицеллюлозу [6]. Именно актиномицеты, наряду с бациллами, наиболее перспективны для интродукции в агроэкосистемы с целью длительного контроля популяций фитопатогенов [7].

Многие актиномицеты наиболее многочисленного рода *Streptomyces* хорошо известны как продуценты антибиотиков, в связи с чем, приоритеты исследования и практического использования стрептомицетов длительное время были связаны с медициной и ветеринарией. В последние десятилетия, благодаря успехам в области молекулярной биологии и геномики, сложились представления о *Streptomyces* spp., как продуцентах широчайшего спектра вторичных метаболитов с биоконтрольной и фиторегуляторной активностью [8–10], открывшей перспективу их использования в растениеводстве и земледелии. К настоящему времени примерно 60% антибиотиков, продуцируемых видами *Streptomyces*, используется в сельском хозяйстве [7].

Несмотря на адаптацию к условиям почвенной среды и широкий метаболический потенциал, почвенные стрептомицеты используются для производства биопрепаратов гораздо реже, чем другие группы PGPR [11, 12]. Одна из причин ограниченного применения стрептомицетов в агротехнологиях связана с риском распространения генов резистентности к антибиотикам в популяциях нецелевых организмов [13]. Во избежание формирования антибиотикоустойчивых форм, в защите растений предпочтительно использовать только антибиотики немедицинского назначения.

Обязательным условием при разработке биологических средств защиты растений является отсутствие у кандидатных штаммов фитотоксичности. Исследование влияния микроорганизмов на рост и развитие хозяйственно ценных растений позволяет также оценить перспективы штаммов для применения в растениеводстве в качестве биостимуляторов. Штаммы рода *Streptomyces*, обладающие одновременно фунгицидным и рост-стимулирующим действием, представляют, как считают исследователи в работе [13], первостепенный интерес.

Необходимое свойство биопрепаратов — сохранение биологической активности в изменяющихся природных условиях, в почвах разного физико-химического состава, с разной степенью плодородия и значениями кислотности [7]. От факторов окружающей среды (колебания температуры, влажность, изменение рН среды, недостаточная концентрация элементов питания, засоление) зависит продукция стрептомицетами вторичных метаболитов. При выборе кандидатных штаммов для разработки эффективных средств биологиче-

ской защиты желательно использовать местные изоляты микроорганизмов, хорошо адаптированных к региональным почвенно-климатическим условиям [14].

Цель — характеристика свойств новых штаммов актиномицетов, выделенных из почв Вятско-Камского Предуралья, их предварительная идентификация и установление химической природы активного вещества.

МЕТОДИКА

Организмы, методы культивирования. Микроорганизмы были выделены из дерново-подзолистых почв, отобранных в окрестностях гг. Киров и Пермь (Россия), и из серой лесной почвы, отобранной в окрестностях Нижнего Новгорода. Отбор проб проводили с глубины 0–10 см. Для посева использовали почву после прогревания при 70°C в течение 4 ч для ограничения роста немикелиальных бактерий. Разведения почвенных суспензий 10^{-3} – 10^{-4} высевали на казеин-глицериновый агар, инкубацию посевов проводили при 28°C в течение 7–14 сут. Отдельные колонии, различающиеся по морфотипу, отсеивали на овсяный агар, очищали и хранили для дальнейшей работы при 4°C. После предварительного тестирования (около 350 изолятов) для дальнейших исследований были отобраны штаммы бактерий 8A13, N27-25 и P15-2. Для сравнения свойств новых изолятов использовали ранее полученный из ризосферы овса на дерново-подзолистой почве штамм *Streptomyces castelarensis* A4, зарекомендовавший себя в полевых испытаниях в качестве эффективного средства ограничения грибных инфекций ряда зерновых культур [15]. Поскольку в дальнейшем виды *S. castelarensis* и *S. antimycoticus* были объединены в один с типовым штаммом *S. antimycoticus* — NBRC 12839T [16], видовой эпитет штамма A4 поменялся на *S. antimycoticus* (код доступа MK784817.1 в GenBank).

Описание культуральных и морфологических признаков. Культуральные признаки штаммов A4, 8A13, N27-25 и P15-2 учитывали после 18 сут инкубации при 28°C на овсяном (ISP 3), крахмально-аммиачном (ISP 4), глицерин-аспарагиновом (ISP 5), пептонно-дрожжевом агаре с железом (ISP 6) [17]. 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 спор изучали с помощью светового микроскопа Leica DM 2500 (“Leica Microsystems”, Германия).

Филогенетический анализ. Филогенетическое положение исследуемых штаммов определяли на основе анализа фрагментов гена 16S рРНК в НПК “Синтол” (Россия). ДНК экстрагировали из чистых изолятов, ген 16S рРНК амплифицировали с помощью ПЦР с использованием

универсальных бактериальных праймеров 16SF75 — AGTGGCGGACGGGTGAGTAA и 16SR1100 — TТАCTAGCGATTCCGACTTCA. Условия для ПЦР использовали следующие: начальная денатурация при 95°C в течение 4 мин, 32 цикла 94°C в течение 20 с, 58°C в течение 30 с и 72°C в течение 45 с, конечная элонгация 5 мин при 68°C. Продукты ПЦР секвенировали на анализаторе ДНК ABI3130xl (“Thermo Fisher Scientific”, США). Первичный сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями из базы данных GenBank проводили с помощью программы NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Полученные последовательности штаммов 8A13, N27-25 и P15-2 были депонированы в GenBank под номерами MT 114717.1, OR215430 и OR215466 соответственно (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>) и использованы для сравнительного филогенетического анализа с родственными типовыми штаммами стрептомицетов в программе MEGA 11 [18]. Для построения филограммы использован метод максимального правдоподобия (Maximum likelihood method).

Определение физиологических особенностей. Рост штаммов A4, 8A13, N27-25 и P15-2 при различных температурах (от 4 до 45°C), в диапазоне pH (от 4 до 9 ед.) и при концентрации NaCl (от 1 до 5%) оценивали на среде Гаузе 1 после инкубации в течение 8–10 сут.

Использование различных источников углерода определяли на среде Придгема и Готтлиба (ISP 9) согласно [19].

Для оценки антибиотикочувствительности штаммов использовали диски индикаторные ДИ-ПЛС-50-01 по ТУ 9398-001-39484474-2000 (НИЦФ, Россия) с антибиотиками в следующих концентрациях: 20 мкг амоксициллин (Amx); 30 мкг налидиксовая кислота (NC); 1.25/23.75 мкг триметоприм/сульфаметоксазол (TS); 30 мкг тетрациклин (Tet); 5 мкг рифампицин (Rif); 300 ЕД полимиксин (Pmx); 15 мкг азитромицин (Azr).

Антагонизм к фитопатогенам изучали методом диффузии в агар на среде Чапека. В качестве тест-объектов использовали фитопатогенные грибы из рабочей коллекции Федерального аграрного научного центра Северо-Востока: *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *F. oxysporum* Schltdl, *F. avenaceum* (Fr.) Sacc, *F. moniliforme* Sheldon, 1904, *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, 1976, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker. Зоны подавления и угнетения роста грибов измеряли без учета диаметра блока (5 мм) с мицелием актиномицета. Все тесты проводили в трех повторностях. Результаты измерения зон ингибирования были визуализированы и подвергнуты кластерному анализу посредством тепло-

вой карты, построенной с помощью веб-сервиса NGCHM-web-builder [20].

Экстракция, очистка и идентификация активного вещества. Изоляты 8A13, N27-25 и P15-2, отобранные в ходе первичного скрининга, а также штамм *S. antimycoticus* A4, выращивали в жидкой среде, содержащей (г/л): глюкоза — 10; пептон — 6.2; дрожжевой экстракт — 2.0; гидролизат казеина — 2.0; NaCl — 2.75; KNO₃ — 0.06; Na₂CO₃ — 0.7; Na₂S₂O₃ — 0.2, при постоянном встряхивании (120 об./мин) в колбах Эрленмейера объемом 250 мл в течение 10 сут.

Культуральные жидкости (КЖ) отделяли от биомассы центрифугированием при 7000 g в течение 10 мин. Супернатант подвергали твердофазной экстракции и первичному фракционированию, пропуская через картридж для ТФЭ “LabTech C18 500 mg/6 ml” (“LabTech Ltd”, Китай) со скоростью 1 капля в секунду. Картридж предварительно промывали последовательно 2 мл метанола и 2 мл воды. Затем фазу с сорбатом промывали 5 мл воды. Сконцентрированные компоненты КЖ элюировали с картриджа 3 мл метанола в стеклянные сборники. Элюат фильтровали через шприцевые полиамидные фильтры (Chromafil Xtra PA-20/13 (“MachereyNagel”, Германия) с диаметром пор 0.2 мкм и помещали в вials. Анализ проводили на tandemном жидкостном хроматомасс-спектрометре LCMS-8040 “Shimadzu Corporation” (Япония) с системой трех квадруполов. Прибор оснащен хроматографической колонкой “Dr. Maisch Reprosil-Pur Basic C18” (“UVISON Technologies”, Великобритания) 100 × 2 мм с размером зерен неподвижной фазы 3 мкм. Условия хроматографирования: температура термостата колонок 35°C, расход подвижной фазы 0.25 мл/мин, режим элюирования — бинарный градиент: фаза А — очищенная вода I типа с добавкой 0.1% муравьиной кислоты; фаза Б — ацетонитрил: начальное содержание 5%, увеличение до 85% с 0.1 по 8 мин; выдержка при 85% с 8 по 20 мин.

Регистрировали хроматограммы по полному ионному току (TIC) и масс-спектры нефрагментированных ионов. Параллельно с регистрацией масс-спектров нефрагментированных ионов, производился автоматический выбор и фрагментация отдельных ионов (ионов-прекурсоров) в соударительной ячейке прибора (в режиме Product Ion Scan) с последующим сканированием продуктов фрагментации (ионов-продуктов).

Режим регистрации спектра: тип ионизации электроспрей (ESI) (положительная полярность), полное сканирование в диапазоне 100–2000 м/з, MS/MS с автоматическим выбором наиболее интенсивного иона, энергия коллизии (CE) — 35 эВ, газообразный азот. Масс-спектры были обработаны с использованием программного обеспечения LabSolutions LCMS 5.86 (“Shimadzu”, Япония).

Идентификацию выявляемых веществ проводили с использованием баз данных Dictionary of Natural products 31.1 (<https://dnpc.chemnetbase.com>).

Определение целлюлазной активности. Бактерии выращивали в минеральной жидкой среде следующего состава (г/л): K_2HPO_4 — 2; NH_4Cl — 2; $NaCl$ — 2; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 1; $MnSO_4$ — 0.05; $FeSO_4 \times 7H_2O$ — 0.05; $CaCl_2 \times 2H_2O$ — 0.1. В качестве единственного источника углерода в жидкую среду вносили измельченную солому (10 г/л). Культивировали при 28°C стационарно в течение 3 сут. Биомассу бактерий осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 6000 об./мин. Для анализа использовали надосадочную жидкость. Активность фермента измеряли при 50°C и pH 5.0 по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров, концентрацию которых определяли спектрофотометрически при 540 нм с реагентом на основе 3,5-динитросалициловой кислоты согласно методике [21]. Активность фермента выражали в условных единицах/10 мин/г. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализировало образование 1 мкмоль редуцирующих сахаров (в пересчете на глюкозный эквивалент) за 1 мин в оптимальных условиях при продолжительности гидролиза 10 мин. Все измерения проводили в трех повторностях, погрешность измерений не превышала 5%.

Изучение способности к продукции ауксинов. Бактерии культивировали в колбах Эрленмейера на качалке (120 об./мин) в течение 7 сут при 28°C. Состав среды (г/л): глюкоза — 2.0, сахароза — 2.0, пептон — 1.0, дрожжевой экстракт — 1.0, K_2HPO_4 — 0.5, $NaCl$ — 0.1, $MgSO_4$ — 0.2, KNO_3 — 0.75, $CaCl_2$ — 0.02, $FeCl_3$ — 0.01, Na_2MoO_4 — 0.002; L-триптофан — 0.1, pH 6.8. Жидкие культуры бактерий центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин для освобождения от клеток микроорганизмов. Определение количества индолилуксусной кислоты (ИУК) проводили с использованием реактива Сальковского на спектрофотометре UVmini-1240 ("Shimadzu", Япония) при длине волны 540 нм. Для построения калибровочного графика использовали разведения стандартного раствора ИУК ("Fluka", Швейцария). Контролем служила среда без инокуляции, но с добавлением реактива.

Оценка фиторегуляторного действия. Штаммы культивировали в жидкой овсяной среде на качалке (120 об./мин) в течение 5 сут при комнатной температуре (20 ± 2°C) до получения суспензии плотностью $(3.8\text{--}4.5) \times 10^7$ колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Оценку проводили методом водно-бумажной культуры. В качестве тест-культур использовали пшеницу яровую (*Triticum aestivum* L.), клевер паннонский (*Trifolium pannonicum* L.), горчицу сарептскую (*Brassica juncea* L.). Семена замачивали на 20 ч в жидких культурах (ЖК) стрептомицетов после разведения водой 1/10 и 1/100 — ЖК 10^{-1} и ЖК 10^{-2} . Контролем служили

семена, замоченные в стерильной воде. По завершении обработки семена помещали между листами (пшеница) или на поверхности (клевер, горчица) увлажненной фильтровальной бумаги и проращивали в водно-бумажной культуре (20 ± 2°C, 6 сут), при фотопериоде 16 ч и освещенности 7 кЛк. Повторность в опытах с пшеницей — 100 (4 рулона по 25 семян), в опытах с клевером и горчицей — 80 (4 чашки Петри по 20 семян). Учитывали всхожесть и сухую биомассу проростков.

Статистическая обработка результатов выполнена стандартными методами с использованием пакета Microsoft Excel 2007. Полученные данные выражали как средние арифметические величины из трех биологических повторностей ± стандартная ошибка средней.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика бактериальных изолятов. Природные изоляты 8A13, N27-25, P15-2, полученные в разное время из географически разобренных почв Вятско-Камского Предуралья (Россия), имели на диагностических ISP-средах сходные культуральные и микроморфологические признаки и незначительно отличались от штамма сравнения *S. antimycoticus* A4 (табл. 1).

Все культуры формировали на ISP-средах неокрашенный субстратный мицелий и воздушный мицелий серого цвета, не продуцировали растворимых и меланоидных пигментов, и только извитые в виде крючков и неправильных спиралей цепочки спор (RA) новых изолятов отличались от цепочек штамма *S. antimycoticus* A4, которые имели форму хорошо развитых спиралей (S).

Новые штаммы 8A13, N27-25, P15-2, как и штамм сравнения A4, росли в диапазоне 19–38°C, однако различались температурными оптимумами, были способны переносить pH среды в пределах 5.0–9.0 (N27-25 — от 4.0 до 9.0), концентрацию $NaCl$ не более 3.0% (A4 — не более 1.5%), гидролизировали казеин, крахмал, карбоксиметилцеллюлозу; продуцировали ИУК в присутствии 100 мкг/мл L-триптофана в практически равных количествах 17.4–20.8 мкг/мл.

В отличие от *S. antimycoticus* A4, новые штаммы оказались способными к ферментативному гидролизу целлюлозы. На среде с соломой в качестве единственного источника углерода активность целлюлазы колебалась от 13.7 ± 1.24 усл. ед./10 мин/г у штамма P15-2 до 10129.9 ± 230.78 усл. ед./10 мин/г у штамма N27-25.

Штаммы различались между собой по способности расти на средах с различными источниками углерода. Новые изоляты 8A13, N27-25, P15-2 отличались от штамма сравнения A4 более широким спектром утилизируемых сахаров. Различались культуры также по спектрам антибиотикорези-

Таблица 1. Культуральные, морфологические и физиологические признаки штаммов

Фенотипические признаки	8Al-3	A4	N27-25	P15-2
Культуральные				
Цвет воздушного мицелия	Светло-серый	Серый	Темно-серый	Светло-серый
Цвет субстратного мицелия	Бесцветный	от бесцветного до желтоватого	бесцветный	от бесцветного до желтоватого
Образование меланоидного пигмента	Не образует	не образует	не образует	не образует
Морфологические				
Форма цепочек спор	Крючки, петли, короткие спирали (RA)	Спиральные (S)	Крючки, петли, короткие спирали (RA)	Короткие спирали (RA)
Поверхность спор	Гладкая	Гладкая	Гладкая	Гладкая
Физиологические				
Максимальная концентрация NaCl, %	3	1.5	3	3
Диапазон pH	5–9	5–9	4–9	5–9
Диапазон температур, °C	19–38	19–38	19–38	19–38
Оптимальная температура, °C	28–37	25–28	25–28	28–30
Биохимические				
Гидролиз казеина	+	+	+	+
Гидролиз крахмала	+	+	+	+
Гидролиз карбоксиметил-целлюлозы	+	+	+	+
Активность целлюлазы, усл. ед./10 мин/г	3782.3 ± 196.49	0	10129.9 ± 230.78	13.7 ± 1.24
Утилизирует углеводы	Глюкоза, ксилоза, лактоза, манит, сахароза, фруктоза	Арабиноза, глюкоза, манит, фруктоза	Арабиноза, глюкоза, ксилоза, лактоза, маннит, сахароза, фруктоза	Арабиноза, глюкоза, ксилоза, лактоза, маннит, сахароза, фруктоза
Не использует углеводы	Арабиноза	Лактоза, сахароза, ксилоза	—	—
Чувствителен к антибиотикам	Pmx, TS, Amx, Tet, Azr, NC	Pmx, Tet, Azr, NC	Pmx, Tet, Azr	Pmx, Tet, Azr, Rif, TS
Устойчив к антибиотикам, мкг	Rif	TS, Amx, Rif	Amx, TS, NC, Rif	Amx, NC
Продукция ИУК, мкг/мл	18.5	17.4	18.9	20.8

Примечание: утилизовались все протестированные в данной работе углеводы.

стентности. Так, штамм N27-25 проявлял резистентность к четырем антибиотикам из разных классов и разных механизмов действия (Amx, TS, NC, Rif), тогда как штамм 8A13 был резистентен только к одному антибиотику — Rif.

Оценка антагонистического действия штаммов на фитопатогены показала, что все стрептомицетные изоляты способны подавлять рост, по крайней мере, семи видов микромицетов. Судя по величине зон ингибирования грибных тест-культур, штаммы 8A13 и P15-2 до 45 ± 1.3 и 52 ± 2.3 мм соответственно превосходили по антифунгальному действию штамм сравнения A4 (до 41 ± 1.2 мм). Однако при построении тепловой карты эти три штамма были объединены автоматизированным алгоритмом в один кластер, тогда как штамм N27-25, антифунгальное действие которого уступало по величине (18–23 мм), занял обособленную от них позицию (рис. 1).

Идентификация активных веществ. Состав компонентов КЖ, полученных при культивировании исследуемых штаммов, изучали методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме сканирования (Q3 Scan) при положительной полярности ионизации в диапазоне m/z от 100 до 2000. При этом регистрировали хроматограммы по полному ионному току (TIC) и масс-спектры нефрагментированных ионов, которые включают в себя, как правило, сигналы обусловленные регистрацией положительно заряженных протонированных молекулярных ионов $[M + H]^+$, образующихся в ионном источнике из нейтральных молекул определяемых компонентов и сохраняющих их структуру. По m/z этих ионов определяли молекулярные массы соответствующих компонентов. Параллельно с регистрацией масс-спектров нефрагментированных ионов производился автоматический выбор и фрагментация отдельных ионов (ионов-прекурсоров) в соударительной ячейке прибора (в режиме Product Ion Scan) с последующим сканированием

продуктов фрагментации (ионов-продуктов). Масс-спектры продуктов фрагментации служили дополнительным источником информации о структуре исходных ионов и, соответственно, молекул анализируемых компонентов.

На хроматограммах образцов, полученных из КЖ штаммов 8A13, N27-25, P15-2 и A4, присутствовали интенсивные пики при времени удержания 0.5–1.5 мин. Первый из пиков обусловлен выходом из хроматографической колонки слабоудерживаемой смеси гидрофильных низкомолекулярных и неорганических соединений. Масс-спектр второго пика содержал характерный набор сигналов m/z (365, 527, 689, 851), отличающихся на 162, что может указывать на смесь аминокликозидных соединений (возможно обладающих активностью антибиотиков), различающихся числом звеньев с указанной массой (рис. 2).

Интенсивные пики присутствовали на хроматограммах образцов также в интервале времени 5.9–7.0 мин (рис. 3). При рассмотрении этих масс-спектров, видно, что имеются пики нефрагментированных ионов с m/z 535.95 и 536, соответствующих молекулярной массе скопафунгина — 1142.5 ($C_{59}H_{103}N_3O_{18}$) <https://dnpc.chemnetbase.com/chemical/ChemicalSearchResults.xhtml?dswid=626>. На основании интенсивности этих пиков можно полагать, что содержание скопафунгина в исследуемых образцах КЖ не превышало 0.05 мкг/л, поэтому нельзя исключить, что высокая антифунгальная активность (рис. 1) обусловлена сочетанием данного антибиотика с другими веществами, которые требуют дальнейшего изучения.

Скопафунгин (scopafungin) — антибиотик из многочисленной группы гуанидинсодержащих полиольных макролидов (известны более 60 выделенных из почвенных и морских актиномицетов соединений и их синтетических производных) [22, 23]. Эти соединения имеют сходную структуру

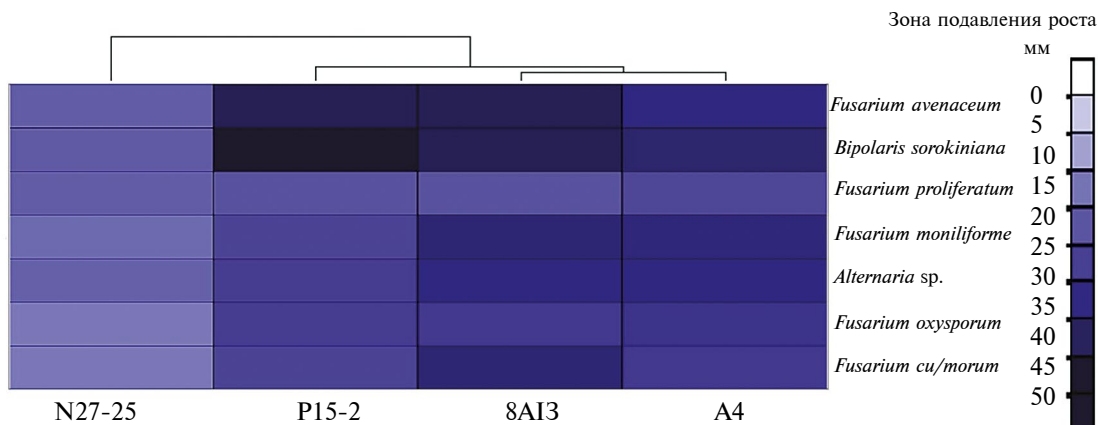


Рис. 1. Тепловая карта, отражающая различия в величине зон ингибирования грибных тест-культур штаммами стрептомицетов.

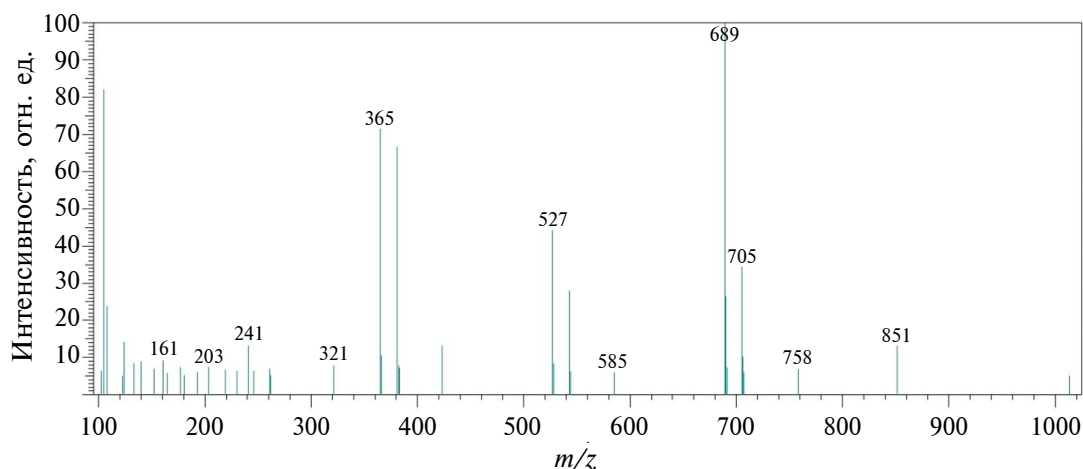


Рис. 2. Масс-спектр нефрагментированных ионов в образце, полученном из КЖ штамма сравнения А4 при времени удержания 1.0 мин.

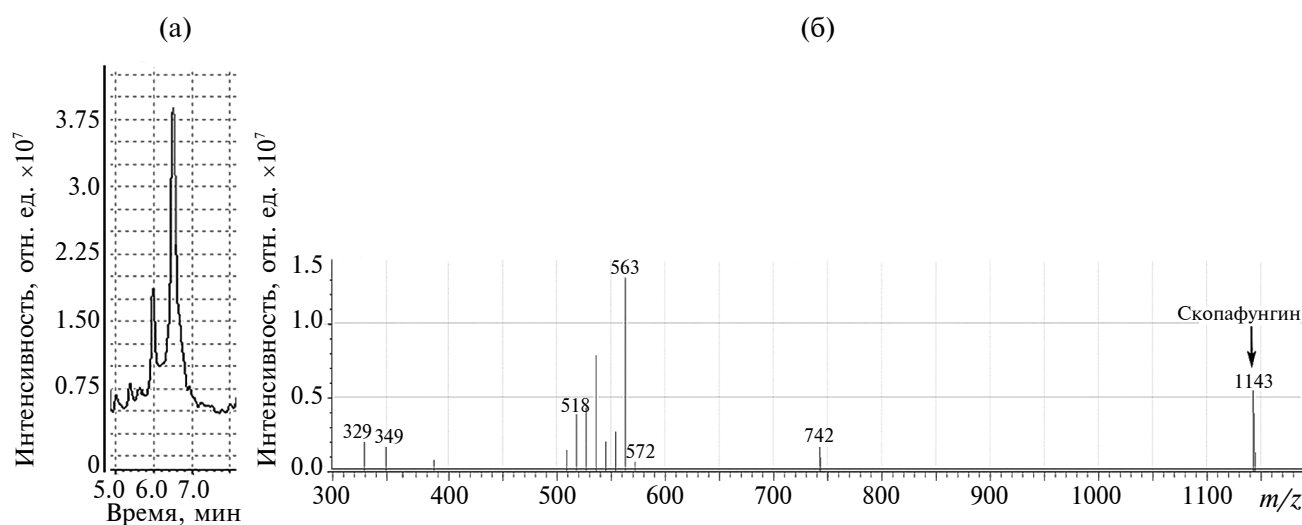


Рис. 3. Хроматограмма (а) и масс-спектр (б) образца, полученного из КЖ штамма 8A13.

ру, содержат лактоновое кольцо и гуанидильную боковую цепь, обладают рядом биологических активностей, в особенности широким спектром противомикробного действия в отношении грамположительных бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов.

Изучение механизмов антибактериальной и антифунгальной активности скопафунгина и его структурных аналогов, показало, что основной мишенью в клетке для них является цитоплазматическая мембрана [24]. Кроме того, скопафунгин угнетает окислительное фосфорилирование в митохондриях [25], способен ингибировать активность НАДН-дегидрогеназы (NDH-II) [26]. Гибель клеток под воздействием изомера скопафунгина — нифимицина Ia объясняется окислительным стрессом, обусловленным резкой потерей глутатиона [27].

Из литературы известно, что нифимицин высоко активен в отношении таких фитопатогенных грибов, как *Alternaria mali*, *Aspergillus oryzae*, *Colletotrichum coccodes*, *C. gloeosporioides*, *Cercospora canescens*, *Cylindrocarpon destructans*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* и *Rhizoctonia solani*, поражающих сельскохозяйственные культуры. Эффективность обработки растений нифимицином в концентрации 50 мкг/мл сопоставима с эффективностью химического фунгицида хлороталонила [24].

Филогенетический анализ. Предварительная идентификация штаммов-продуцентов скопафунгина, основанная на анализе фрагмента гена 16S рРНК, подтвердила, что культуры 8A13, N27-25 и P15-2 являются представителями рода *Streptomyces*, семейства *Streptomycetaceae*, порядка *Kitasatosporales*, класса *Actinomycetes*. Сравнение

полученных нуклеотидных последовательностей с другими представленными в GenBank последовательностями позволило с высокой долей вероятности (уровень сходства составил более 99%) заключить, что изучаемые микроорганизмы являются ближайшими генетическими родственниками видов *S. antimycoticus* (8A13, P15-2) и *S. hygroscopicus* (N27-25).

На основе данных о нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК было построено филогенетическое дерево (рис. 4), на котором выделился кластер, включающий последовательности изучаемых культур *S. antimycoticus* P15-2, A4, *S. hygroscopicus* N27-25 и последовательность, принадлежащую штамму *Streptomyces* sp. NEAU-ZSY13. Штамм NEAU-ZSY13 был выделен в провинции Хэйлунцзян (Китай) из листа периллы кустящейся (*Perilla frutescens*) [23]. Установлена антифунгальная активность этого эндофита в отношении 17 почвенных фитопатогенных грибов, особенно сильная против *Bipolaris sorokiniana*. Кроме того, штамм NEAU-ZSY13 ингибировал рост почвенной фитопатогенной бактерии *Ralstonia solanacearum*. Химический анализ экстрактов эндофитного стрептомицета NEAU-ZSY13 с использованием спектроскопии ядерного магнитного резонанса выявил в качестве основных действующих веществ

нифимицины С и А [23]. Последовательности 16S рРНК штаммов P15-2, A4, N27-25 совпадали с последовательностью штамма NEAU-ZSY13 на 97.84, 99.21, 99.54% соответственно.

Штамм *S. antimycoticus* 8A13 на филогенетическом дереве вошел в один кластер с культурами *S. hygroscopicus* subsp. *enhygrus* KP6107 и *Streptomyces* sp. FIM95-F1. Антифугальную активность *S. hygroscopicus* subsp. *enhygrus* KP6107 в отношении широкого спектра грибных фитопатогенов авторы связывают с продукцией нифимицина [24]. Последовательность штамма 8A13 на 99% идентична последовательности штамма KP6107.

О продукции скопафунгина морским изолятом *Streptomyces* sp. FIM95-F1 сообщалось в работе [28]. При анализе *in silico* данных полногеномного секвенирования штамма FIM95-F1 авторы обнаружили, по крайней мере, два новых кластера биосинтетических генов, что указывало на наличие у него значительного потенциала в отношении получения новых биологически активных соединений для разработки лекарств [29]. Филогенетическое родство штаммов FIM95-F1 и 8A13 по фрагменту гена 16S рРНК оценивалось в 99.4%

Таким образом, выявлено тесное филогенетическое сходство между вновь полученными почвенными изолятами *S. antimycoticus* P15-2, 8A13,

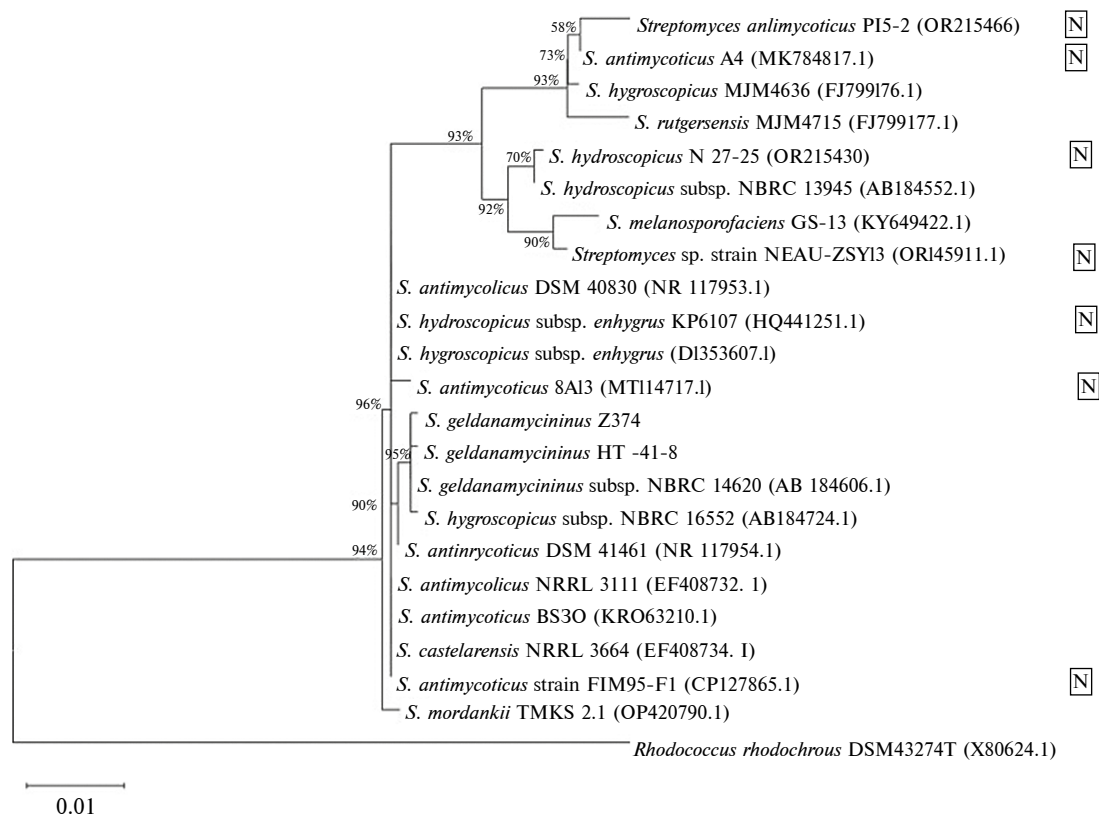


Рис. 4. Филогенетическое положение исследуемых штаммов стрептомицетов и штаммов — продуцентов скопафунгина [N], на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК.

S. higrscopicus N27-25, биофунгицидным штаммом *S. antimycoticus* A4 и представленными в NSBI последовательностями продуцентов антифунгальных антибиотиков скопафунгина *Streptomyces* sp. FIM95-F1, нифимицина *S. higrscopicus* subsp. *enhygrus* KP6107, нифимицинов С и А *Streptomyces* sp. NEAU-ZSY13. Высокую степень гомологии данных нуклеотидных последовательностей подтверждает достаточно высокая достоверность их кластеризации – 93–95% (рис. 4).

Поскольку известна способность представителей рода *Streptomyces* продуцировать метаболиты, как стимулирующие, так и подавляющие рост растений, на следующем этапе работы были изучены эффекты воздействия новых штаммов стрептомицетов на проростки пшеницы яровой, клевера паннонского, горчицы сарептской, как представителей семейств злаковых (*Gramineae*), бобовых (*Fabaceae*) и крестоцветных (*Brassicaceae*) соответственно.

Реакция на обработку семян зависела от штамма стрептомицета, степени разведения ЖК (10^{-1} и 10^{-2}) и таксономической принадлежности растения. Штамм сравнения *S. antimycoticus* A4 в разведении 10^{-1} , как и в предыдущих исследованиях, оказал на растения слабое угнетающее действие, незначительно снизив всхожесть и сухую биомассу проростков пшеницы и горчицы, но при этом существенно повышал всхожесть бобовой культуры (табл. 2). Новые штаммы 8A13, P15-2

и N27-25, напротив, оказали на растения стимулирующее действие. Так, штамм 8A13 положительно влиял на накопление биомассы проростками всех тест-культур, а у семян горчицы и клевера стимулировал всхожесть. В результате обработки семян штаммом P15-2 наблюдали существенное увеличение сухой биомассы у проростков пшеницы и горчицы, а обработка штаммом N27-25 сопровождалась увеличением показателей всхожести и биомассы у всех использованных в тесте растений.

* * *

Результаты изучения культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств новых почвенных изолятов *S. antimycoticus* 8A13, P15-2 и *S. higrscopicus* N27-25 указывают на их фенотипическое и филогенетическое сходство как между собой, так и с ранее выявленным штаммом *S. antimycoticus* A4, который в полевых условиях продемонстрировал биофунгицидное действие, сопоставимое по эффективности защиты растений с коммерческими препаратами. Каждый из изолятов, полученных из различных по генезису почв Вятско-Камского Предуралья, оказывал угнетающее действие на грибные фитопатогены. Идентифицировано активное вещество с антифунгальным эффектом – скопафунгин. Хотя этот антибиотик впервые был выделен в 1967 г., в медицинской практике он не применялся, ввиду чего продуценты скопафунгина имеют предпочтительное пре-

Таблица 2. Всхожесть и сухая биомасса проростков таксономически различных растений в зависимости от обработки семян культурами стрептомицетов

Штамм	Пшеница яровая		Клевер паннонский		Горчица сарептская	
	КЖ 1 : 10	КЖ 1 : 100	КЖ 1 : 10	КЖ 1 : 100	КЖ 1 : 10	КЖ 1 : 100
Всхожесть, %						
Контроль без обработки	73.0 ± 6.0		63.5 ± 8.82		67 ± 3.83	
% к контролю						
A4	93.8	н.д.	123.0*	н.д.	81.0	н.д.
8A13	100.0	106.0	106.0	125.0*	142.0*	98.0
P15-2	127.4*	102.7	94.0	80.0	98.9	98.9
N27-25	118.6*	118.6*	100.0	118.0*	103.3	104.4
Биомасса проростков, г						
Контроль без обработки	0.23 ± 0.03		0.024 ± 0.0061		0.088 ± 0.0202	
% к контролю						
A4	75.0*	н.д.	100	н.д.	62.5	н.д.
8A13	96.5	115.9*	166*	100	87.5	120*
P15-2	130.4*	100.0	97.0	83.4	111.6	130.9*
N27-25	127.8	133.3*	100.4	118.7*	125.1*	127.4*

Примечание: в контроле указаны средние значения и их стандартные отклонения, объем выборки для пшеницы $n = 100$, для клевера и горчицы $n = 80$.

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

имущество для использования в растениеводстве, поскольку отвечают стратегии противодействия распространению антибиотикорезистентности среди клинически значимых микроорганизмов.

Выделенные из разных почв, но филогенетически близкие штаммы 8A13, N27-25 и P15-2, наряду с биоконтрольным действием на фитопатогены, продуцировали ИУК, оказывали рост-стимулирующее действие на зерновые, бобовые и крестоцветные культуры. Они обладали также целлюлолитической активностью, что обуславливало их способность разлагать инфицированные фитопатогенами лигноцеллюлозные корневые и пожнивные остатки, способствуя оздоровлению почвы в агроценозах. Обладая комплексом полезных для растений свойств, штаммы *Streptomyces* 8A13, N27-25 и P15-2 могут быть использованы в качестве кандидатных для создания биофунгицидов и разработки природоподобных технологий органического растениеводства и земледелия.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания FNWE-2022-0005 Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2024. /Eds. H. Willer, J. Trávníček, S. Schlatter. Research Institute of Organic Agriculture FiBL, Frick, and Bonn. IFOAM — Organics International, 2024. 352 p.
2. Pérez-Montaña F., Alías-Villegas C., Bellogín R.A., del Cerro P., Espuny M.R., Jiménez-Guerrero I. et al. // Microbiol. Res. 2014. V. 169. P. 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>
3. Basu A., Prasad P., Das S.N., Kalam S., Sayyed R.Z., Reddy M.S., El Enshasy H. // Sustainability. 2021. V. 13. P. 1–20. <https://doi.org/10.3390/su13031140>
4. Seipke R.F., Kaltenpoth M., Hutchings M.I. // FEMS Microbiol. Rev. 2012. V. 36. P. 862–876. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00313.x>
5. Bonaldi M., Chen X., Kunova A., Pizzatti C., Saracchi M., Cortesi P. // Front. Microbiol. 2015 V. 6. P. 25. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00025>
6. Javed Z., Tripathi G. D., Mishra M., Dashora K. // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2021. V. 31. P. 101893. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101893>
7. Павлюшин В.А., Новикова И.И., Бойкова И.В. // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. № 3. С. 421–438. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.3.421rus>
8. Cordovez V., Carrion V. J., Etalo D.W., Mumm R., Zhu H., van Wezel, G.P., Raaijmakers J.M. // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 1081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01081>
9. Viaene T., Langendries S., Beirinckx S., Maes M., Goormachtig S. // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92. № 8. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw119>
10. Basic Biology and Applications of Actinobacteria. / Ed. Enany S. (Ed.). IntechOpen, 2018. P. 99–122.
11. Vurukonda S.S. K.P., Giovanardi D., Stefani E. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 4. P. 952. <https://doi.org/10.3390/ijms19040952>
12. Pacios-Michelen S., Aguilar Gonzalez C.N., Alvarez-Perez O.B., Rodriguez-Herrera R., Chávez-González M., Arredondo Valdes R., Ilyina A. // Front. Sustain. Food Syst. 2021. V. 5. P. 696518. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.696518>
13. Rey T., Dumas B. // Trends in Plant Science. 2017. V. 22. № 1. P. 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.008>
14. Supranta D.N. // J. ISSAAS. 2012. V. 18. № 2. P. 1–8.
15. Широких И.Г., Бакулина А.В., Назарова Я.И., Широких А.А., Козлова Л.М. // Микология и фитопатология. 2020. Т. 54. № 1. С. 59–66. <https://doi.org/10.31857/S0026364820010080>
16. Komaki H., Tamura T. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 1099–1105. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003882>
17. Shirling E.B., Gottlieb D. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1966. V. 16. P. 313–340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
18. Tamura K., Stecher G., Kumar S. // Mol. Biol. Evol. 2021. V. 38. № 7. P. 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
19. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 245 с.
20. Ryan M.C., Stucky M., Wakefield C., Melott J.M., Akbani R., Weinstein J.N., Broom B.M. // F1000Res. (ISCB Comm J). 2019. V. 8. P. 1750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20590.2>
21. Ghose T.K. // Pure & Appl. Chem. 1987. V. 59. № 2. P. 257–268.
22. Song X., Yuan G., Li P., Cao S. // Molecules. 2019. V. 24. P. 3913. <https://doi.org/10.3390/molecules24213913>

23. Wang Z., Gao C., Yang J., Du R., Zeng F., Bing H., Liu C. // Front. Microbiol. 2023. V. 14. P. 1243610. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1243610>
24. Kim H.Y., Kim J.D., Hong J.S., Ham J.H., Kim B.S. // J. Basic. Microbiol. 2013. V. 53. P. 581–589. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200045>
25. Reusser F. // Biochem. Pharmacol. 1972. V. 21. P. 1031–1038. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(72\)90408-x](https://doi.org/10.1016/0006-2952(72)90408-x)
26. Mogi T., Matsushita K., Murase Y., Kawahara K., Miyoshi H., Ui H. et al. // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 291. P. 157–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01451.x>
27. Nakayama K., Yamaguchi T., Doi T., Usuki Y., Taniguchi M., Tanaka T. // J. Biosci. Bioeng. 2002. V. 94. P. 207–211. <https://doi.org/10.1263/jbb.94.207>
28. Fei P., Yang X., Lu-jie C., Hong J., Yun-yang L. // Natural Product Research & Development. 2011. V. 23. № 5. P. 809–814.
29. Fei P., Wenzhou Z., Yangjun L., Yuee Z., Ping L., Yiwen Z., Linlin C. // Genome-based Analysis for the Biosynthetic Potential of *Streptomyces* sp. FIM 95-F1 Producing Antifungal Antibiotic Scopafungin. 2023. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3052084/v1>

New Agronomically Valuable Strains of the Genus *Streptomyces* and Their Biochemical Characteristics

I. G. Shirokikh^{a, b, *}, N. A. Bokov^{a, b}, A. A. Alalykin^b, and A. A. Shirokikh^{a, b}

^aFederal Agricultural Research Center of the North-East named N.V. Rudnitsky, Kirov, 610007 Russia

^bVyatka State University, Kirov, 610000 Russia

*e-mail: irgenal@mail.ru

Organic farming is a global trend that increases the demand for biological preparations for use in agricultural production. The paper characterizes new actinomycete isolates from soil samples taken in various agroecosystems of the Vyatka-Kama Urals. As a result of preliminary testing (about 350 strains), strains 8A13, N27-25 and P15-2 were isolated on the basis of antifungal activity. The cultures were identified by 16S rRNA as bacteria of the genus *Streptomyces*. The active substance with antifungal effect — scopafungin was identified using HPLC-MS/MS. Along with the inhibitory effect on phytopathogenic fungi, these strains produce auxins in the presence of 100 mcg/ml of L-tryptophan (17.4–20.8 mcg/ml), have cellulolytic activity and have a stimulating effect on germination and accumulation of dry biomass by wheat, clover and mustard seedlings. Possessing a complex of beneficial properties for plants, *Streptomyces* strains 8A13, N27-25 and P15-2 can be used as candidates for the creation of biological preparations with fungicidal and phytostimulating effects.

Keywords: streptomyces, biofungicides, growth stimulation, auxins, cellulase, control of phytopathogens