

**ШТАМ АКТИНОМІЦЕТІВ *STREPTOMYCES* SP. JE 1-93,
ПРОДУЦЕНТ АНТИФУНГАЛЬНИХ АНТИБІОТИКІВ**

С. Тістечок, В. Федоренко, О. Громико*

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: oleksandr.gromyko@lnu.edu.ua

Скринінг нових природних біологічно активних сполук є однією з ефективних стратегій формування портфелю платформ для розробки нових хіміопрепаратів у боротьбі з мультирезистентними штамми мікроорганізмів. Актиноміцети є надзвичайно плодотворним джерелом структурно різноманітних вторинних метаболітів, значна частина яких має фармацевтичне чи біотехнологічне значення. Серед них варто відзначити рід *Streptomyces*, який продукує близько 55 % усіх відомих антибіотиків природного походження. Проте через значне повторне відкриття вже відомих сполук, особливо серед актиноміцетів, швидкість відкриття нових антибіотиків значно сповільнилося. На сьогодні виникає дедалі більший інтерес до скринінгу біоактивних сполук із малодосліджених та екстремальних середовищ існування. У цьому дослідженні ми демонструємо філогенетичну характеристику, біологічну активність і дереплікацію вторинних метаболітів ізоляту Je 1-93, виділеного з ризосферного ґрунту ялівцю високого (*Juniperus excelsa* M. Bieb.). За аналізом нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК ізолят Je 1-93 афілійовано до роду *Streptomyces*, при цьому найбільша спорідненість виявлена зі штамом *S. hydrogenans* CA04 (100 % ідентичність). Аналіз антимікробної активності цього штаму продемонстрував його сильну антифунгальну дію проти референтного штаму *Candida albicans* ATCC 885-653, а також полірезистентного штаму *C. albicans* №12, стійкого до ністатину, амфотерицину В, клотримазолу, ітраконазолу, кетоконазолу та флуконазолу. Щоб визначити сполуки, котрі, ймовірно, забезпечують антифунгальну активність, ми здійснили дереплікативний аналіз вторинних метаболітів, які продукує штам *Streptomyces* sp. Je 1-93. Щоб полегшити дереплікацію, отримані екстракти вторинних метаболітів розділяли, застосовуючи ексклюзивну хроматографію на колонці, наповненій сефадексом LH-20. Метанол використовували як рухоми фазу. В результаті дереплікативного аналізу в базі даних природних сполук (Dictionary of Natural Products), серед вторинних метаболітів у екстракті Je 1-93 виявлено антибіотики антиміцини, які з великою імовірністю забезпечують антифунгальну активність цього штаму.

Ключові слова: *Streptomyces*, антифунгальна активність, філогенетичний аналіз, антиміцини, ризосферні мікроорганізми

Значне та часто неконтрольоване використання антибіотичних препаратів у боротьбі з інфекціями призвело до розвитку множинної резистентності у патогенних мікроорганізмів до наявних препаратів [22]. Це зумовлює потребу в постійному скринінгу нових природних біологічно активних речовин з антибіотичною активністю, включаючи скринінг нових продуцентів уже відомих сполук, які в біотехнологічному аспекті можуть бути ефективнішими, порівняно з існуючими. Актиноміцети широко розповсюджені у природі, характеризуються високим вмістом G+C у своїх геномах і є одними з ключових джерел біологічно активних природних сполук, насамперед антибіотиків [2]. Вони

виробляють більше 70 % усіх відомих антибіотиків природного походження, особливо рід *Streptomyces*, на який припадає 55 % усіх відомих антибіотичних сполук. Більшість хіміотерапевтичних препаратів, які використовують нині у клінічній практиці, розроблено на основі природних продуктів стрептоміцетного походження [4].

Протягом «золотого віку» антибіотиків, який тривав з 1940-х до 1960-х років, відкрито найпоширеніші й до сьогодні сполуки та виділено штами-продуценти. Однак тепер відкриття та впровадження в клінічну практику нових антибіотиків значно сповільнилося. Це можна пояснити значним повторним відкриттям уже відомих сполук, переважно синтезованих актиноміцетами [5]. Однією зі стратегій для вирішення цієї проблеми є скринінг продуцентів у нових недостатньо вивчених або екстремальних середовищах існування. Одним із таких середовищ існування є Кримський півострів. Попередні дослідження авторського колективу довели, що біотопи Кримського півострова є надзвичайно продуктивним джерелом нових біоактивних речовин мікробного походження. Виділені нові природні антибіотики олеокеран, олеоміцини А і В, рубіміцінон А виявляють антибактерійну (здебільшого проти грамположитивних бактерій), фунгіцидну і цитотоксичну дію [11, 12, 14]. Продуценти цих сполук – стрептоміцети, ізольовані з ризосфери рослин, інтродукованих на території Нікітського ботанічного саду (Україна, АР Крим, селище Нікіта). Крім того, продуцентів нових сполук, таких як юніперолід А, леополінова кислота (розглядається як потенційний агент у боротьбі з SARS CoV-2 [10]) виявлено серед стрептоміцетів ризосфери *Juniperus excelsa* Vieb. у підніжжі г. Кішка (південне узбережжя, п-ів Крим) [13–15]. Також у ризосфері цієї рослини виявлено продуценти антибіотиків лідикаміцинів, десерторміцину А, канханаміцину А, бутилциклогептилпродигіозин, спектинабілін, для яких описані антибактеріальна, антифунгальна, протималарійна та інші активності [1, 20].

У цьому дослідженні ми продовжуємо характеризувати властивості природних ізолятів актиноміцетів, виділених із ризосфери *J. excelsa*, а саме штаму актиноміцетів *Streptomyces* sp. Je 1-93, який виявляє високий рівень антифунгальної дії щодо референтного та полірезистентного штамів *C. albicans*.

Матеріали та методи

Штами й умови вирощування. У роботі використано актиноміцетний ізолят Je 1-93, виділений із ризосферного ґрунту *J. excelsa*, зібраного біля підніжжя г. Кішка (південне узбережжя Криму) (GPS: N 44°24–02.07” E 33° 59–32.96”). Цей штам виділено шляхом прямого посіву водних суспензій ґрунту на агаризоване НВА середовище [24]. Тест-культури *Bacillus subtilis* ATCC31324, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883, *Proteus vulgaris* ATCC 29905, *Candida albicans* ATCC 885-653 та штам *C. albicans* №12 використовували для визначення антимікробних активностей. Ізолят Je 1-93 (колекційний номер Lv 239) і тест-культури зберігається в Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка.

Штам Je 1–93 вирощували у стандартних умовах [6], використовуючи середовище з манітом і соєвим борошном (МС) (20,0 г/л соєвого борошна, 20,0 г/л D-маніт, 2,00 г/л агар; рН 7,2), вівсяне середовище (ВС) (20,0 г/л вівсяне толокно, 20,0 г/л агару; рН 7,2). Рідкий триптон-соєвий бульйон (TSB, Sigma-Aldrich) застосовували для виділення ДНК. Для вирощування тест-штамів бактерій використовували середовище LA [6], для дріжджів – середовище Сабуро [6], для продукції вторинних метаболітів – рідке середовище SG (глюкоза – 20 г/л; соєвий пептон – 10 г/л; CaCO₃ – 2 г/л; рН 7.2).

Визначення антимікробних властивостей ізоляту *Je 1-93*. Антимікробні властивості ізоляту Je 1-93 визначали як описано в [19], використовуючи при цьому такі тест-культури:

грампозитивні бактерії *B. subtilis*, *S. aureus*; грамнегативні бактерії *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *P. vulgaris*; дріжджів *C. albicans* і штаму *C. albicans* №12, виділений від хворого з дисбіотичним порушенням травного тракту, резистентний до ністатину, амфотерицину В, клотримазолу, ітраконазолу, кетоконазолу та флуконазолу.

Антимікробну активність екстрактів визначали диско-дифузійним методом. Екстракти (25 мкл) наносили на стерильні паперові диски ($d = 4$ мм), диски висушували та поміщали на підготовані чашки зі середовищем Сабуро й тест-культурою. Як негативний контроль застосовували паперові диски з метанолом. Після 24 год культивування за 28 °С зони інгібування росту вимірювали з точністю ± 1 мм.

Філогенетичний аналіз ізоляту *Je 1-93*. Для виділення сумарної ДНК ізолят *Je 1-93* вирощували в середовищі TSB протягом 3 днів за 28 °С та швидкості струшування 180 об/хв. Сумарну ДНК виділяли методом, як описано раніше [6].

Для ампліфікації гена 16S рРНК здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів 8F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') і 1510R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'). ПЛР-суміш загальним об'ємом 50 мкл, що містила 5 мкл 10-кратного буфера для ПЛР (Thermo Scientific, США), 1,0 мкл суміші дезоксинуклеозидтрифосфатів (10,0 мМ кожен, Thermo Scientific, США), 0,5 мкл кожного праймера (100 пмоль), 0,5 мкл *Taq* ДНК-полімерази (1 Од/мкл, Thermo Scientific, США), 2,5 мкл диметилсульфоксиду, 2,0 мкл ДНК-матриці (~50 нг) та 38,0 мкл MilliQ води. Параметри ПЛР були такі: початкова денатурація за 95 °С протягом 5 хв, потім 30 циклів денатурації за 95 °С протягом 30 с, відпал праймерів за 53 °С протягом 30 с, синтез за 72 °С протягом 90 с і досинтез за 72 °С протягом 10 хв. Продукт ПЛР візуалізували в 1 % агарозному гелі. Отриманий ампліфікований фрагмент (1385 п. н.) ділянки гена 16S рРНК очищали, використовуючи QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Нідерланди), та секвенували за методом Сенджера в компанії Eurofins Genomics (GATC Services). Філогенетичний аналіз нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК здійснено у програмі RDP Classifier Release 11 [23]. Пошук найспорідненіших видів серед актиноміцетів здійснювали, застосовуючи програму BLAST бази даних NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Філогенетичне дерево будували за допомогою алгоритму з'єднання сусідів [16], що ґрунтується на двопараметровій моделі Кімури [7] у програмі MEGA X [8]. Достовірність топології філогенетичного дерева оцінювали за допомогою бутстреп-тесту в 1000 повторів.

Екстракція вторинних метаболітів ізоляту *Je 1-93* та їхній дереплікативний аналіз. Для продукції вторинних метаболітів використовували рідке середовище SG. Вторинні метаболіти екстрагували з культуральної рідини рівним об'ємом етилацетату, з біомаси – сумішшю ацетон : метанол у співвідношенні 1 : 1. Для фракціонування вторинних метаболітів застосовували ексклюзивну хроматографію, використовуючи скляну колонку (30 мм x 1000 мм) та заповнену Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA), як рухоми фазу використовували метанол. Збирання фракцій відбувалося кожні 5 хв, швидкість потоку 2 мл/хв. Отримані фракції випарювали, розчиняли в 1 мл метанолу і тестували на активність проти штаму *C. albicans*. Активні екстракти вторинних метаболітів змішували й аналізували, використовуючи систему вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) та 10-см колонку ACQUITY UPLC R BEH C18, 1,7 мкм (Waters, Milford, MA, США). Рухома фаза в системі ВЕРХ складалася з двох розчинників: води (розчин А) й ацетонітрилу (розчин Б), підкислених мурашиною кислотою (0,1 %). Концентрації розчинника змінювалися в лінійному градієнті від 5 до 95 % розчинника Б, протягом 18 хв, швидкість потоку 0,6 мл/хв. Виявлення мас проводили в позитивному режимі з діапазоном виявлення 150–2000 *m/z*. Систему ВЕРХ підключали або до швидкісного мас-спектрометра (МС) ama-Zon, або до системи високої роздільної здатності LC-QTOF maXis (Bruker, США), що дало

зможу проводити мас-спектрометричний аналіз екстрактів. Для аналізу даних використано програмне забезпечення Bruker Compass Data Analysis версії 4.2 (Bruker, Billerica, MA, США). Скринінг сполук проводили з використанням бази даних DNP версії 10.0 (Dictionary of Natural Products) за такими параметрами: точна молекулярна маса, УФ-спектри, аналіз фрагментації та джерела виділення.

Результати і їхнє обговорення

Аналіз антимікробної активності й філогенетична характеристика ізоляту *Je 1-93*. У цій роботі використано ізолят актиноміцетів *Je 1-93*, виділений із ризосферного ґрунту *J. ex-celsa* методом прямого висіву водних суспензій на агаризоване середовище НВА. Цей ізолят добре росте на поживних агаризованих середовищах, зокрема, на вівсяному середовищі, окрім субстратного, утворює добре розвинений повітряний міцелій, спори зі шипоподібною поверхнею оболонки, які формуються на спіральних спорангіях (рис. 1, А і Б).

Філогенетичний аналіз нуклеотидної послідовності майже повного гена 16S рРНК ізоляту *Je 1-93* (1385 пн) за допомогою онлайн-платформи RDB Classifier дав змогу афілювати його до роду *Streptomyces*. Нуклеотидна послідовність фрагмента гена 16S рРНК штаму *Je 1-93* була задепонована в базі даних нуклеотидних послідовностей GenBank з ідентифікаційним номером OP389125.

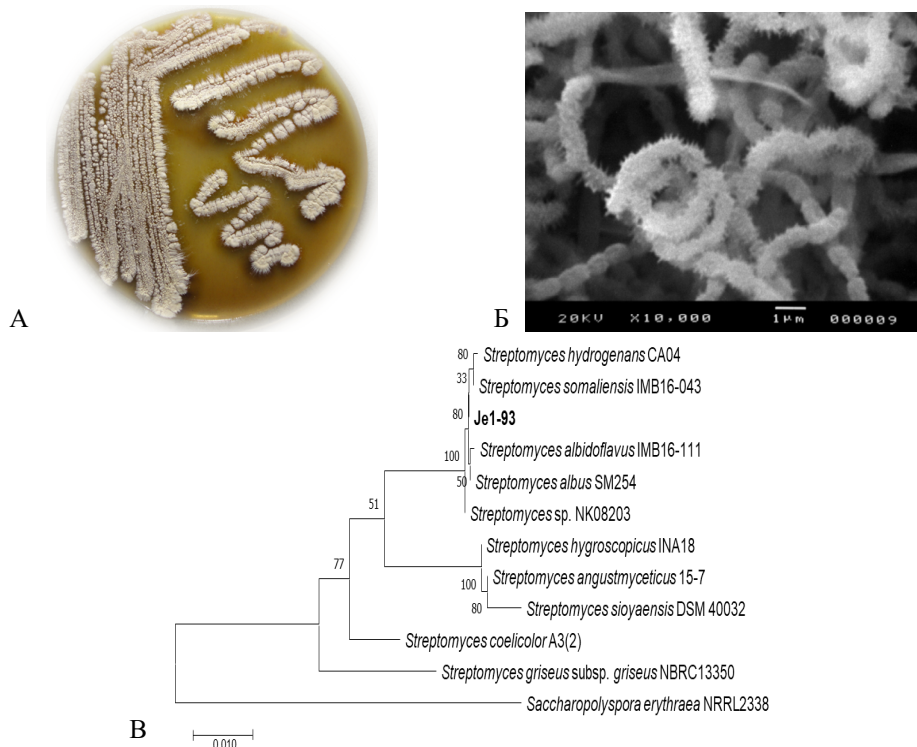


Рис. 1. Таксономічна характеристика штаму актиноміцетів *Streptomyces sp. Je 1-93*: А – ріст на вівсяному середовищі; Б – скандувальна електронна мікросвітлина поверхні спор штаму *Streptomyces sp. Je 1-93* після вирощування на вівсяному середовищі протягом 3 тижнів за $t=28^{\circ}\text{C}$, збільшення $\times 10\,000$; В – філогенетичне дерево на основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК штаму *Je 1-93*, 5 найближчих сусідів і кількох репрезентативних типових штамів *Streptomyces*. Для вкорінення дерева використали послідовність гена 16S рРНК *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338

Аналіз послідовності гена 16S рРНК цього ізоляту за допомогою онлайн-ресурсу BLAST у базі даних NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) виявив, що Je 1-93 є найбільш спорідненим (100 % ідентичність) зі *S. hydrogenans* штамом CA04 (MK530175). Аналіз філогенетичного дерева, яке включало нуклеотидну послідовність генів 16S рРНК ізоляту Je 1-93, 5 штамів стрептоміцетів, які демонстрували найвищу спорідненість, і кількох репрезентативних штамів стрептоміцетів виявив, що досліджуваний ізолят групується зі стрептоміцетами й утворює щільні клади зі спорідненими штамми (рис. 1, В). Таким чином, беручи до уваги дані філогенетичного аналізу, ізолят Je 1-93 класифіковано як представника роду *Streptomyces* – найбільшої групи актиноміцетів, представленої штамми, поширеними у водних і наземних екосистемах. Представники цього роду становлять комерційний інтерес завдяки їхній здатності синтезувати велику кількість біологічно активних вторинних метаболітів, включно з антибіотиками, такими як тетрацикліни, аміноглікозиди, макроліди, рифаміцини та ін. [3].

Дослідження антимікробної активності проти широкого пулу тест-культур продемонструвало, що ізолят Je 1-93 виявляє помітну активність проти референтного штаму дріжджових грибів *C. albicans* і полірезистентного шпитального ізоляту *C. albicans* №12. Проте досліджуваний ізолят не виявляв активності проти грампозитивних *B. subtilis*, *S. aureus* і грамнегативних бактерій *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* та *P. vulgaris*. Активність ізоляту лише проти одноклітинних грибів *C. albicans*, очевидно, зумовлена продукцією антифунгального антибіотика(ів). Незважаючи на те, що антифунгальні препарати, які використовують у клініці, досить численні, наразі доступні лише кілька класів цих засобів. Їх застосовують у лікуванні слизових або системних інфекцій, спричинених штамми *Candida* spp. [9, 18]. Також постійне виникнення резистентних штамів стимулює дослідників до пошуку дедалі новіших антимікробних препаратів, у тому числі з антифунгальною дією.

Дереплікативний аналіз сполук із антифунгальною дією штаму *Streptomyces* sp. Je 1-93. Для визначення сполук, які, ймовірно, забезпечують антифунгальну активність, ми здійснили дереплікативний аналіз вторинних метаболітів, які продукує штам *Streptomyces* sp. Je 1-93. Щоб отримати екстракти вторинних метаболітів, штам Je 1-93 вирощували в 3 л середовища SG протягом 7 днів за температури 28 °C та швидкості струшування 180 об/хв. Після вирощування біомасу відокремлювали від культуральної рідини центрифугуванням (10 хв за 9 тис. об/хв). Для екстракції вторинних метаболітів із культуральної рідини застосовували етил ацетат, із біомаси – суміш метанол : ацетон у співвідношенні 1 : 1. Отримані екстракти випарювали і концентрували. Для полегшення дереплікації отримані екстракти вторинних метаболітів розділяли за допомогою ексклюзивної хроматографії у скляній колонці, наповненій сефадексом LH-20. Метанол застосовували як рухоми фазу. В результаті отримали 60 фракцій екстракту штаму *Streptomyces* sp. Je 1-93. Отримані фракції відбирали й аналізували на здатність пригнічувати ріст *C. albicans*. Активність проти досліджуваної тест-культури демонстрували фракції від 34 до 45 (рис. 2, А).

Визначені активні фракції змішували й аналізували за допомогою ВЕРХ-МС. На хроматограмі активної фракції, отриманої після розділення, ідентифіковано два основних (мажорних) масових піки. За допомогою високоточної мас-спектрометрії було визначено маси сполук, що утворюють ці піки. Пік 1 утворювала сполука з масою m/z 549.28 $[M+H]^+$, пік 2 – сполука з масою m/z 563.29 $[M+H]^+$ (рис. 2, Б).

Дереплікативний аналіз моноізотопних мас ідентифікованих сполук у базі даних природних сполук визначив їх як антиміцин А1 та А10 (рис. 3). Крім того, пошук мас інших антиміцинів на отриманій хроматограмі дав змогу ідентифікувати й інші сполуки з

групи антиміцинів. Це дало змогу, крім антиміцинів А1 і А10, ідентифікувати антиміцини А3, А12, А14, А15 і А16. Це група природних антибіотиків стрептоміцетного походження, яким властива сильна антифунгальна активність. Структура антиміцинів, яких на сьогодні відомо більше 40, містить 9-членне дилактонне ядро, сполучене з частиною 3-формамідосаліцилової кислоти (рис. 3). Механізм дії антиміцинів полягає у пригніченні активності цитохром-с-редуктази в ланцюзі транспортування електронів і зупинці дихання [17]. Також антиміцини розглядають як потенційні протипухлинні препарати, які можна застосовувати в комбінації з іншими хімотерапевтичними засобами. Для антиміцинів виявлено інгібіторну активність щодо мітохондріальних антиапоптотичних білків Bcl-2 і Bcl-xL, які надмірно виробляються раковими клітинами, стійкими до хімотерапевтичних препаратів [21].

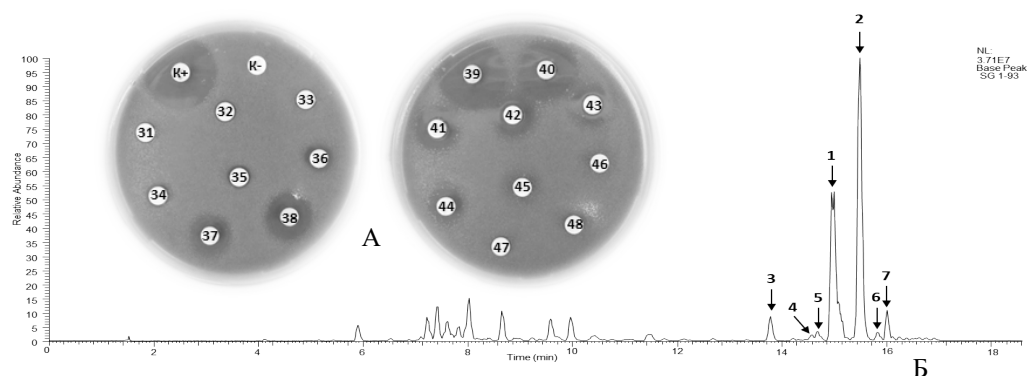


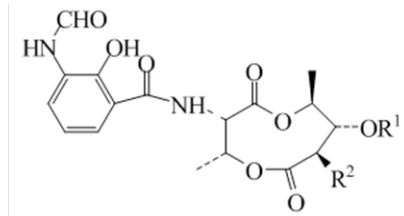
Рис. 2. Аналіз активних фракцій екстракту штаму *Streptomyces* sp. Je 1-93. Антифунгальна активність проти *C. albicans*: K+ – нерозділений екстракт; K- – метанол; 31–48 – фракції розділеного екстракту штаму *Streptomyces* sp. Je 1-93 (А); ВЕРХ-МС хроматограма суміші активних фракцій екстракту (Б); стрілки вказують на ідентифіковані антиміцини, характеристики яких наведено в таблиці

Характеристики ідентифікованих антиміцинів

№ піку	Сполука	Час виходу, хв	m/z[M+H] ⁺	Точна маса	UV, нм
1	Антиміцин А1	14.98	549.278889	548.273383	226, 319
2	Антиміцин А10	15.55	563.292873	562.289033	228, 321
3	Антиміцин А3	13.86	521.238214	520.242083	225, 320
4	Антиміцин А12	14.62	549.278889	548.273383	226, 319
5	Антиміцин А14	14.78	563.292873	562.289033	228, 321
6	Антиміцин А15	15.88	563.292873	562.289033	228, 328
7	Антиміцин А16	16.09	563.291792	562.289289	228, 331

Таким чином, із ризосферного ґрунту *J. excelsa* виділено бактерійний ізолят Je 1-93, який за результатами філогенетичного аналізу на основі нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК афілійовано до роду *Streptomyces*. Штам виявляє високий рівень антифунгальної дії проти дріжджів *C. albicans*, у т. ч. мультирезистентного штаму № 12. В екстрактах вторинних метаболітів штаму Je 1-93 виявлено фракції з антифунгальними активностями. У результаті дереплікативного аналізу активних екстрактів ідентифіковано масові піки, що відповідають антибіотикам антиміцинам, для яких описана антифунгальна дія. Отже, з високою імовірністю можна сказати, що штам *Streptomyces* sp. Je 1-93 продукує антибіотики антиміцини, які можуть зумовлювати антифунгальну активність штаму.

Результати, отримані в цій роботі, демонструють потенціал актиноміцетів із природних біотопів України як джерел біологічно активних речовин.



Антиміцин А1 – R1- COCH(CH₃)CH₂CH₃, R2- (CH₂)₅CH₃
Антиміцин А3 – R1- COCH₂CH(CH₃)₂, R2- (CH₂)₅CH₃
Антиміцин А10 – R1- COCH₂CH(CH₃)₂, R2- (CH₂)₃CH₃CH₂CH₃
Антиміцин А12 – R1- COCH₂CH₂CH(CH₃)₂, R2- CH₂CH₂CH(CH₃)₂
Антиміцин А14 – R1- COCH₂CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃, R2- (CH₂CH₂CHCH₃)₂
Антиміцин А15 – R1- COCH₂CH(CH₃)₂, R2- (CH₂)₅CH₃
Антиміцин А16 – R1- COCH₂CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃, R2- (CH₂)₅CH₃

Рис. 3. Структурні формули ідентифікованих антиміцинів

Фінансування

Дослідження були частково підтримані індивідуальним грантом FEMS-GO-2017-001 для Степана Тістечка та проєктом Н/309-2003 МОН України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Тістечок С., Дацюк Ю., Федоренко В., Громико О. Штам актиноміцетів *Streptomyces* sp. Je 1-42: філогенетичний аналіз, біологічні властивості та спектр вторинних метаболітів // Фактори експериментальної еволюції організмів. 2020. Т. 27. С. 276–281. doi:10.7124/FEEEO.v27.1338.
2. Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2015. Vol. 80. N 1. P. 1–43. doi:10.1128/MMBR.00019-15.
3. De Lima Procópio R. E., da Silva I. R., Martins M. K. et al. Antibiotics produced by *Streptomyces* // Braz. J. Infect. Dis. 2012. Vol. 16. N 5. P. 466–471. doi:10.1016/j.bjid.2012.08.014.
4. De Simeis D., Serra S. Actinomycetes: A Never-Ending Source of Bioactive Compounds—An Overview on Antibiotics Production // Antibiotics. 2021. Vol. 10. P. 483. doi:10.3390/antibiotics10050483.
5. Katz L., Baltz R. H. Natural product discovery: past, present, and future // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2016. Vol. 43. P. 155–176. doi:10.1007/s10295-015-1723-5.
6. Kieser B. M., Buttner M. J., Charter K. F., Hopwood D. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich (United Kingdom): John Innes Foundation, 2000. 613 p.
7. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. Vol. 16. P. 111–120. doi:10.1007/bf01731581.
8. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. Vol. 35. P. 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096.
9. Mathew B. P., Nath M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses // Chem. Med. Chem. 2009. Vol. 4. N 3. P. 310–323. doi: 10.1002/cmdc.200800353.

10. *Mazzini S., Musso L., Dallavalle S., Artali R.* Putative SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors from an In-House Library of Natural and Nature-Inspired Products: A Virtual Screening and Molecular Docking Study // *Molecules*. 2020. Vol. 25(16). P. 3745. doi: 10.3390/molecules25163745
11. *Raju R., Gromyko O., Butsiak A.* et al. Oleamycins A and B: new antibacterial cyclic hexadepsipeptides isolated from a terrestrial *Streptomyces* sp. // *J. Antibiotics*. 2014. Vol. 67. P. 339–343. doi:10.1038/ja.2014.1.
12. *Raju R., Gromyko O., Fedorenko V.* et al. Rubimycinone A, a new anthraquinone from a terrestrial *Streptomyces* sp. // *Tetrahedron Lett.* 2013. Vol. 54. N 8. P. 900–902. doi:10.1016/j.tetlet.2012.11.130.
13. *Raju R., Gromyko O., Fedorenko V.* et al. Leopolic acid A, isolated from a terrestrial actinomycete, *Streptomyces* sp. // *Tetrahedron Lett.* 2012. Vol. 53. N 46. P. 6300–6301. doi:10.1016/j.tetlet.2012.09.046.
14. *Raju R., Gromyko O., Fedorenko V.* et al. Oleaceran: A novel Spiro[isobenzofuran-1,2'-naphtho[1,8-bc]furan] isolated from a terrestrial *Streptomyces* sp. // *Organic Lett.* 2013. Vol. 15. N 14. P. 3487–3489. doi:10.1021/ol401490u.
15. *Raju R., Gromyko O., Fedorenko V.* et al. Juniperolide A: A New Polyketide Isolated from a Terrestrial Actinomycete, *Streptomyces* sp. // *Organic Lett.* 2012. Vol. 14. N 23. P. 5860–5863. doi:10.1021/ol302766z.
16. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. Vol. 4. P. 406–425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
17. *Seipke R. F., Hutchings M. I.* The regulation and biosynthesis of antimycins // *Beilstein J. Org. Chem.* 2013. Vol. 9. P. 2556–2563. doi:10.3762/bjoc.9.290.
18. *Souza A. C. O., Amaral A. C.* Antifungal Therapy for Systemic Mycosis and the Nanobiotechnology Era: Improving Efficacy, Biodistribution and Toxicity // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8. P. 336. doi: 10.3389/fmicb.2017.00336.
19. *Tistechok S. I., Mytsyk Y. Y., Fedorenko V. O., Gromyko O. M.* Biosynthetic potential of actinomycetes from *Helianthemum stevenii* Rupr. Ex Juz. & Pozd. Rhizosphere // *Innov. Biosynt. Bioeng.* 2019. Vol. 3. N 2. P. 105–113. doi:10.20535/ibb.2019.3.2.170129.
20. *Tistechok S. I., Tymchuk I. V., Korniychuk O. P.* et al. Genetic Identification and Antimicrobial Activity of *Streptomyces* sp. Strain Je 1–6 Isolated from Rhizosphere Soil of *Juniperus excelsa* Bieb. // *Cytol. Genet.* 2021. Vol. 55. P. 28–35. doi:10.3103/S0095452721010138.
21. *Tzung S. P., Kim K., Basañez G.* et al. Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3 // *Nat. Cell Biol.* 2001. Vol. 3. P. 183–191. doi:10.1038/35055095.
22. *Ventola C. L.* The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats // *Pharmacy and Therapeutics*. 2015. Vol. 40. N 4. P. 277–283.
23. *Wang Q., Garrity G. M., Tiedje J. M., Cole J. R.* Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. Vol. 73. N 16. P. 5261–5267. doi:10.1128/AEM.00062-07.
24. *Zhang J., Zhang L.* Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes // *Modern Applied Science*. 2011. Vol. 5. N 2. doi: 10.5539/mas.v5n2p124

Стаття надійшла до редакції 19.10.22

доопрацьована 11.11.22

прийнята до друку 14.11.22

**AN ACTINOMYCETE STRAIN OF *STREPTOMYCES* SP. JE 1-93:
A PRODUCER OF ANTIFUNGAL ANTIBIOTICS**

S. Tistechok, V. Fedorenko, O. Gromyko

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: oleksandr.gromyko@lnu.edu.ua*

Screening new naturally occurring biologically active compounds is an effective strategy for creating a portfolio of platforms for developing new chemical agents against multidrug-resistant microbial strains. Actinomycetes are an extremely prolific source of structurally diverse secondary metabolites, most of which have pharmaceutical or biotechnological significance. Among them, the genus *Streptomyces* stands out, producing about 55 % of all known naturally occurring antibiotics. However, due to the significant rediscovery of already known compounds, especially among actinomycetes, the rate of discovery of new antibiotics has slowed considerably. Today, there is growing interest in screening biologically active compounds from poorly studied and extreme habitats. In this study, we demonstrated the phylogeny, bioactivity and dereplication of secondary metabolites of the Je 1-93 strain isolated from the rhizosphere soil of juniper (*Juniperus excelsa* Bieb.). Phylogenetic analysis of the Je 1-93 strain based on the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene allowed its identification in the *Streptomyces* genus and showed the greatest similarity with the *S. hydrogenans* CA04 strain (100 % identity). Analysis of the antimicrobial activity of this strain showed its strong antifungal activity against the reference *Candida albicans* ATCC 885-653 strain as well as the multi-resistant *C. albicans* №12 strain, which is resistant to nystatin, amphotericin B, clotrimazole, itraconazole, ketoconazole and fluconazole. To identify compounds that probably provide antifungal activity, we analysed secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. Je 1-93. To facilitate dereplication, the obtained extracts of secondary metabolites were separated by size-exclusion chromatography on a column filled with Sephadex LH-20. Methanol was used as the mobile phase. As a result of the dereplication analysis in the database of natural compounds (Dictionary of Natural Products), antibiotic antimycins were found among the secondary metabolites in the extract of the Je 1-93 strain, and they have a high probability of providing the antifungal activity of this strain.

Keywords: *Streptomyces*, antifungal activity, phylogenetic analysis, antimycins, rhizosphere microorganisms