

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРСПЕКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА БИОПЕСТИЦИДОВ ШТАММА *STREPTOMYCES TAURICUS* 19/97M ПРИ РОСТЕ НА РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ

ASSESSMENT OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE PROMISING PRODUCER OF BIOPESTICIDES, STRAIN *STREPTOMYCES TAURICUS* 19/97M, WHEN GROWING ON VARIOUS SUBSTRATES

**I. Gaidasheva
I. Tarasova
S. Staleva**

Summary. The object of the study was the strain *Streptomyces tauricus* 19/97M, deposited in the All-Russian Collection of Plant Protection Products as a potential producer of plant protection products. Previously, the pronounced biological activity of the pigment form strain in relation to the apigment form was described during the treatment of cereal and coniferous plant seeds. The aim of this work was to study the dependence of the accumulation of red spectrum metabolites on the carbon source introduced into the nutrient medium. And also to evaluate the biological activity of the culture liquid after cultivation. The study was carried out using spectrophotometric analysis of the culture liquid at a wavelength of 577.5 nm. Germination energy, germination, and infection of rye seeds after dressing were analyzed using the standard method (GOST 12038-84). The results of the study showed that starch is the most effective carbon source for the accumulation of red spectrum metabolites. The analysis of biological activity also confirmed the effectiveness of these metabolites, but also showed an inhibitory effect on the energy of germination, which is associated with their high concentration during the growth of the producer on starch. Extraction of red spectrum metabolites from the culture liquid and their spectral analysis were carried out. It was shown that the spectra are close to antibiotics of the quinone and anthracycline group, rhodomycins and cinerubins. This work will further allow us to select an effective medium for obtaining biopesticides based on this producer.

Keywords: actinomycete, biopesticide, biological activity, germination.

Введение

Актиномицеты являются продуцентами биологически активных веществ: антибиотиков, ауксинов — стимуляторов роста, витаминов, ингибиторов ферментов, антиприонов, противовирусных соединений. [4,10,12,14]. Эти важные для сельского хозяйства вещества позволяют рекомендовать актиномицеты, как

Гайдашева Ирина Игоревна

Кандидат биологических наук, доцент,
Московский политехнический институт
gaidashevaii@mail.ru

Тарасова Ирина Альбертовна

Кандидат технических наук, доцент,
Московский политехнический институт
irina_tarassova@mail.ru

Сталева София Денисовна

Московский политехнический институт
sofstaleva@mail.ru

Аннотация. Объектом исследования являлся штамм *Streptomyces tauricus* 19/97M, депонированный в ВКПМ в качестве потенциального продуцента средств защиты растений. Ранее описывалась выраженная биологическая активность штамма пигментной формы по отношению к апигментной при обработке семян злаковых и хвойных растений. Целью данной работы было изучить зависимость накопления метаболитов красного спектра от вносимого в питательную среду источника углерода. А также оценить биологическую активность культуральной жидкости после культивирования. Исследование проводили с использованием спектрофотометрического анализа культуральной жидкости при длине волны 577,5 нм. Анализ энергии прорастания, всхожести, инфицированности семян ржи после протравливания проводили по стандартной методике (ГОСТ 12038-84). Результаты исследования показали, что крахмал является наиболее эффективным источником углерода для накопления метаболитов красного спектра. Анализ биологической активности так же подтвердил эффективность данных метаболитов, но и показал ингибирующее действие на энергию прорастания, что связано с их высокой концентрацией при росте продуцента на крахмале. Была проведена экстракция метаболитов красного спектра из культуральной жидкости и их спектральный анализ. Было показано, что спектры близки к антибиотикам группы хинонов и антрациклинов, родомицинам и цинерубинам. Данная работа в дальнейшем позволит подобрать эффективную среду для получения биопестицидов на основе данного продуцента.

Ключевые слова: актиномицет, биопестицид, биологическая активность, всхожесть.

перспективных продуцентов биологических средств защиты и/или стимуляции роста и продуктивности. Актиномицеты являются продуцентами биологически активных веществ: антибиотиков, ауксинов — стимуляторов роста, витаминов, ингибиторов ферментов, антиприонов, противовирусных соединений. [6,8,11]. В обзорной статье за 7 лет (2007–2014 гг.) представлено более 70 публикаций, которые посвящены вторичным метабо-

литам, полученным из морских актиномицетов [6]. Разнообразие веществ, продуцируемых актиномицетами и их широкий спектр активности позволяют рекомендовать актиномицеты, как перспективных продуцентов, в том числе и биологических средств защиты и/или стимуляции роста и продуктивности сельскохозяйственных культур [1,5,8,14]. Такие биологические препараты — это щадящие средства для контроля динамики численности патогенной микрофлоры, увеличения продуктивности растений и урожайности посевов [4, 6, 1, 5]. Подбор и оптимизация состава питательных сред важнейший этап в разработке технологии получения «продукта» на основе микроорганизмов. Исследователи показывают, что различные источники углерода могут оказывать различное влияние на рост актиномицетов и их биосинтез [9,3,11,12,13,14], а значит и на эффективность.

Для штамма *Streptomyces tauricus* 19/97M, потенциального продуцента биологических средств защиты растений и стимулятора роста, характерно накопление метаболитов красного спектра, предположительно антибиотиков и стимуляторов роста, которые пока не идентифицированы до известных соединений [4]. Ранее в работах исследователей было отмечено, что при росте на стандартной крахмало-аммиачной среде штамм оказывает стимулирующее действие на энергию прорастания и всхожесть семян злаковых культур, отмечено снижение внутренней инфекции посевного материала [2,4,7]. Однако не проанализирована зависимость накопления метаболитов штамма от источника углерода, внесенного в питательную среду. Так же не исследована зависимость биологической активности метаболитов штамма *Streptomyces tauricus* 19/97M от источника углерода в составе питательной среды в отношении семян злаков.

Целью данной работы было провести анализ метаболитов красного спектра находящихся в культуральной жидкости после культивирования штамма. Изучить зависимость накопления этих метаболитов от вносимого в питательную среду источника углерода, оценить их биологическую активность. Данные исследования в дальнейшем позволят рекомендовать эффективную среду для получения биопестицидов на основе данного штамма.

Объекты и методы

Объектом исследования был штамм *Streptomyces tauricus* 19/97M (Sveshnikova 1957; Pridman et al., 1958). Штамм депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов как перспективный для стимулирования роста и защиты сеянцев хвойных от возбудителей болезней, вызываемых грибами родов *Fusarium* и *Alternari*. Ферментацию штамма проводили при pH среды 7.2 (кислотность контролировали вне-

сением в субстрат фосфатно-щелочного буфера) при температуре 27 °C глубинным способом в орбитальном термостатируемом шейкер-инкубаторе при скорости 150 об/мин на стандартной крахмало-аммиачной среде. Из литературных источников известно, что наибольшую антагонистическую активность на стандартной крахмало-аммиачной среде штамм *Streptomyces tauricus* 19/97M проявляет на 5–6 сутки глубинного культивирования. В связи с этим учет морфологии колоний, накопления метаболитов проводили на 6 сутки культивирования штамма. Экстракцию нативных растворов осуществляли *n*-бутанолом при нескольких значениях pH. Так исходное значение pH составляло 7,2, для экстракции веществ основной природы использовали pH 3,8–4,5, а для кислых 6,8. Хроматографическое разделение смеси метаболитов проводили электрофорезом на бумаге в следующих электролитах: 1 н уксусная кислота, pH=2,4, 550 V и 30 %-я уксусная кислота, pH=1,7, 550 V в течение 2–3 часов. Для этого на полоску хроматографической бумаги Filtrack FN-14 (Germany) размером 20×42 см наносили анализируемые образцы культуральной жидкости штамма и стандарты известных антибиотиков (тетрацилин, карминомицин, стрептомицин, хлорамфеникол) на стартовую линию, расположенную на 1 см ниже средней линии полоски в сторону катода. Электрофоретическую подвижность антибиотиков определяли по величине смещения вещества в сантиметрах от линии старта к катоду. Полученные фракции исследовали с применением библиотеки антибиотиков в ФГБУН НИИНА им. Г.Ф. Гаузе. Выделенные антибиотики исследовали методом UV-спектроскопии.

Для анализа влияния метаболитов штамма на энергию прорастания и всхожесть семян использовали среду с различными источниками углерода следующего состава:

Источник углерода (индикаторный крахмал, сахара, мальтоза) — 10 г/л
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2 г/л;
 NaCl — 1 г/л
 K_2HPO_4 — 1 г/л
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 1 г/л
 Буферный раствор pH 7,2 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$) — 1000 мл

Семена обрабатывали супернатантом полученным после разделения культуральной жидкости и биомассы центрифугированием (3000 об/мин, 15 мин) и фильтрованием через мембранный фильтр (Membrane-solutions). Семена замачивали в полученном растворе согласно методике ГОСТа 12038–84 «Методы определения всхожести». Спектрофотометрический анализ накопления метаболитов осуществляли при длине волны равной 577.5 нм.

Результаты и обсуждение

Электрофоретическое исследование при кислых pH выявило наличие двух биологически активных фрак-

ций «красного цвета» — электронейтральной и мигрирующей к катоду. Стандартный образец тетрациклина в электролите мигрировал к катоду на 5,3 см, антибиотик карминомицин — на 5,2 см, антибиотик стрептомицин — на 8,3 см, «красный антибиотик» из исследуемого штамма — на 3,3 см, нейтральный «красный антибиотик» и хлорамфеникол оставался в точке нанесения. По результатам электрофореза можно утверждать, что данные фракции не относятся ни к одному из взятых для анализа стандартных для рода *Streptomyces* антибиотиков. Наиболее полно извлечение метаболитов красного спектра проходит в кислых значениях pH. Данные UV-vis показали, что полученные фракции относятся к антибиотикам группы хинонов и группы антрациклинов. Наиболее близкие спектры метаболитов показали схожесть с родомицином и карнамицином, но не соответствуют им полностью. Это позволяет предположить, что данные фракции, возможно, являются новыми не изученными антибиотиками. В связи с перспективой дальнейшего применения культуральной жидкости штамма *Streptomyces tauricus* 19/97M в качестве биопестицидов не было необходимости в тонкой очистке «красных фракций». Поэтому было предложено использовать методы спектрофотометрического анализа по изменению интенсивности окраски культуральной жидкости в красном спектре при определенной длине волны.

В ходе культивирования на разных источниках углерода штамм *Streptomyces tauricus* 19/97M формировал шарообразные пелеты. Отмечено, что размер, форма и интенсивность цвета пелет значительно зависела от углевода, использованного для питания культуры (рисунок 1).

Пелеты штамма вне зависимости от источника углерода были выпуклыми, с гладкой поверхностью, края ровные. Значительно отличались колонии и культуральная жидкость по интенсивности окраски. Так, наиболее интенсивный цвет был отмечен при росте на крахмале, наименее интенсивный на мальтозе. При этом разме-

ры пелет напротив наиболее крупные были на средах с мальтозой и достигали 8 мм, на сахарозе 2 мм, на средах с крахмалом 3 мм. Согласно данным результатам, можно предположить, что при равных условиях культивирования большая часть углерода при использовании сред с крахмалом интенсивнее используется для синтеза вторичных метаболитов, в частности метаболитов «красного спектра».

На основании полученных спектрофотометрическим методом данных об оптической плотности построен график зависимости оптической плотности от времени культивирования (рисунок 2). Исходя из данных, отраженных на рисунке 2 максимальное накопление метаболитов красного цвета, наблюдается на 6 сутки, при использовании крахмала в качестве единственного источника углерода. Можно сделать вывод, что штамм *Streptomyces tauricus* 19/97M обладает амилазной активностью, что позволяет более эффективно расщеплять крахмал до глюкозы и использовать ее в биосинтезе. При использовании сахарозы накопление метаболитов красного спектра прекратилось на 4 сутки. Оптическая плотность составила 0.3 ед. на крахмальном источнике и менее 0.1 ед. на сахарозной и мальтозной питательной среде.

Таким образом изучение накопления метаболитов красного спектра убедительно показывает повышение совокупной концентрации метаболитов при культивировании на средах с мальтозой и крахмалом и снижение их концентрации на средах с сахарозой к 6 суткам культивирования. При этом максимальная оптическая плотность наблюдается на крахмальной среде, что подтверждает вывод об эффективности использования крахмала для накопления активных метаболитов.

Было предположено, что высокая совокупная концентрация метаболитов красного спектра будет значительно влиять на энергию прорастания, всхожесть и снижение внутренней инфекции семян. Т.е на среде



Рис. 1. Особенности культуральной среды и колоний штамма *Streptomyces tauricus* 19/97M при культивировании на средах с источниками углерода: А — мальтоза, Б — сахароза, В — крахмал

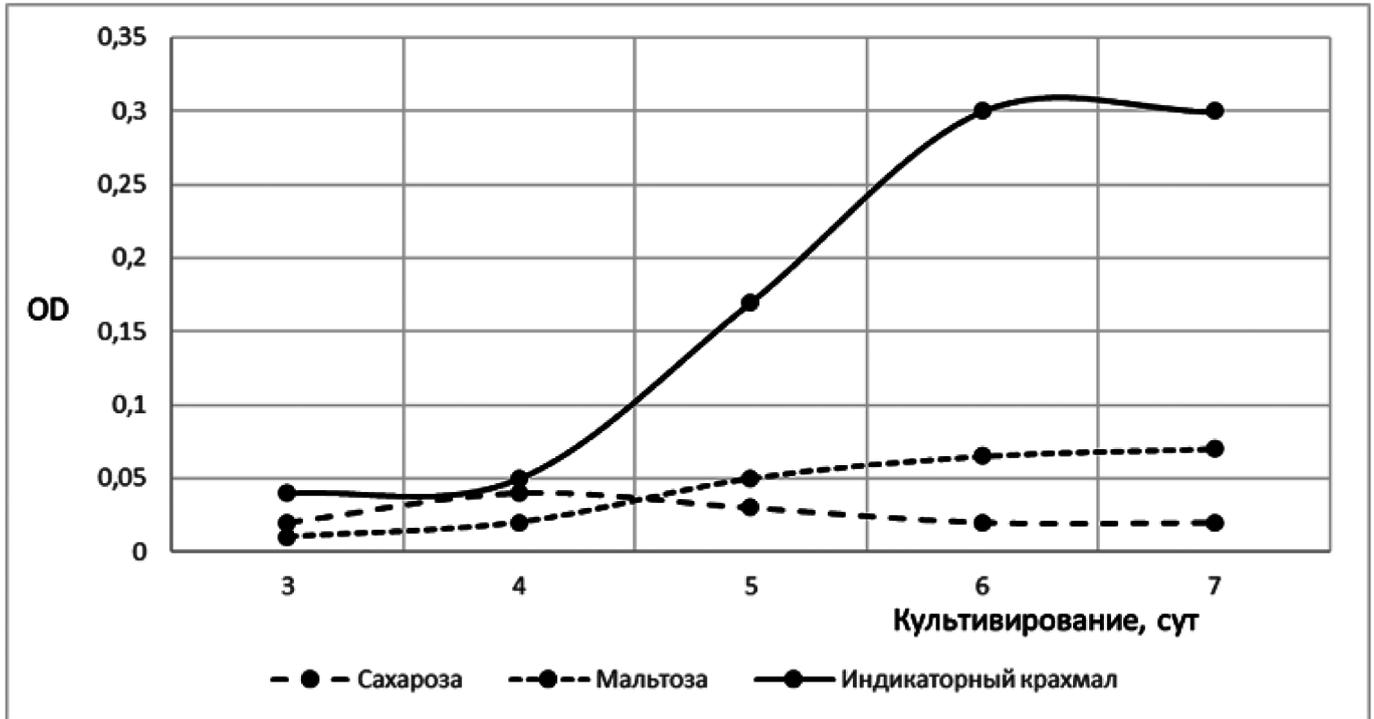


Рис. 2. Динамика накопления метаболитов в культуральной среде

с крахмалом эти показатели будут выше, чем на других средах.

Результаты, полученные в ходе исследования биологической активности метаболитов штамма *Streptomyces tauricus* 19/97M представлены в таблице 1. Из полученных данных следует, что метаболиты по-разному влияют на ростовые показатели семян злаковых культур. Вопреки предполагаемым результатам семеня, которые замачивались во вторичных метаболитах с индикаторным крахмалом, имеют сниженный процент прорастаемости (33,2 %), т.е метаболиты, полученные на данной среде, оказывают ингибирующее действие. Слишком высокая концентрация любых веществ может ингибировать процессы роста. Вероятно, концентрация стимулирующих метаболитов была слишком высока, что подтверждается и высокой оптической плотностью в предыдущем опыте.

Таблица 1.

Влияние метаболитов штамма *Streptomyces tauricus* 19/97M на ростовые показатели семян ржи

Источник углерода	OD культур. ср.	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Инфицированность, %
Мальтоза	0.054	52.7 ± 2.4	58.4 ± 2.5	24 ± 1
Сахароза	0.023	45.2 ± 2.1	49.2 ± 2.3	28 ± 1.5
Крахмал	0.310	33.2 ± 2,0	80.0 ± 1.0	1.2 ± 0.05
Контроль (стерильная вода)	0.000	38.0 ± 4.0	40.0 ± 1.3	34 ± 1.1

Всхожесть семян обычно определяется генетическим составом семян и внутренней инфекцией и отличается от энергии прорастания, поэтому всхожесть оценивали через 7 суток после протравливания метаболитами штамма. Исходя из полученных данных, отраженных в таблице, можно сделать вывод, что культуральная среда с метаболитами, выращенными на среде с крахмалом, хорошо влияет на всхожесть семян и составляет 80 %, что 1.5–2.0 раза выше, чем на мальтозе, сахарозе и в контроле (стерильная вода). Данные о всхожести так же подтверждаются значениями оптической плотности на разных субстратах, на крахмальной и мальтозной среде и концентрация метаболитов, и всхожесть выше, чем на среде с сахарозой.

Исследование подавления внутренней инфекции семян показало, что метаболиты штамма *Streptomyces tauricus* 19/97M имеют вещества способные подавлять патогены. Данный комплекс интенсивнее накапливается на среде Гаузе с содержанием индикаторного крахмала, 1,2 % семян были инфицированы. Менее интенсивное влияние было с использованием мальтозного субстрата — 24 % инфицирования. Зерна, которые были, замочены на субстрате с сахарозой, имеют самые высокие показатели заражаемости — 28 %. Отсюда можно сделать вывод, что сахароза и мальтозы не эффективны для накопления антибиотического комплекса данным штаммом.

Заключение

В ходе исследования были обнаружены две фракции красного цвета, которые по спектру не соответствуют

ни одному из известных антибиотиков доступных для анализа. Показана зависимость накопления этих фракций от источника углерода, внесенного в питательную среду. Исследована зависимость биологической активности метаболитов штамма *Streptomyces tauricus* 19/97M от источника углерода в составе питательной среды в отношении семян ржи. Среда, в состав которой входил крахмал — единственный источник углерода, является

наиболее эффективной. Показатели всхожести и подавления инфекции значительно выше, чем на других средах. В виду обнаруженного ингибирующего эффекта высокой концентрации совокупных метаболитов на энергию прорастания необходимо провести исследование и подобрать оптимальную концентрацию. Что позволить более экономично расходовать метаболиты при использовании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойкова И.В. Вторичные метаболиты актиномицетов — основа для создания новых инсектицидных биопрепаратов / И.В. Бойкова // Вестник защиты растений. — 2016. — № 3(89). — С. 30–32. — EDN WYRCPT.
2. Влияние обработки семян сосны обыкновенной микробными и фитопрепаратами на сохранность семян и свойства почвы в лесном питомнике / О.Э. Пашкеева, И.Д. Гродницкая, Г.И. Антонов [и др.] // Лесоведение. — 2021. — № 2. — С. 143–155. — DOI 10.31857/S0024114821020066. — EDN CADZEU.
3. Влияние состава крахмала на биосинтез иммунодепрессанта такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д / В.Ю. Пошехонцева, В.В. Фокина, Г.В. Суходольская [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. — 2019. — Т. 55, № 5. — С. 481–491. — DOI 10.1134/S0555109919040147. — EDN JGGBCB.
4. Гайдашева И.И. Культивирование штамма *Streptomyces lateritius* 19/97 М (перспективы создания биопрепарата для стимуляции роста и защиты растений от болезней): специальность 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Гайдашева Ирина Игоревна. — Красноярск, 2011. — 175 с. — EDN QFCVTL.
5. Изучение метаболитов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 для создания экологически безопасных средств защиты растений / Ю.В. Батаева, Л.Н. Григорян, Е.А. Курашов [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. — 2021. — № 3. — С. 172–178. — DOI 10.25750/1995–4301–2021–3–172–178. — EDN PUEIBM.
6. Орлова Т.И., Булгакова В.Г., Полин А.Н. Вторичные метаболиты морских микроорганизмов. I. Вторичные метаболиты морских актиномицетов. Антибиотики и Химиотерапия. 2015; 60(7–8):47–59.
7. Патент № 2261902 С2 Российская Федерация, МПК C12N 1/20, A01N 63/00, C12R 1/465. Штамм актиномицета *Streptomyces lateritius* 19/97-М, используемый для стимулирования роста и защиты семян хвойных от возбудителей болезней, вызываемых грибами родов *Fusarium* и *Alternaria* : № 2003100579/13 : заявл. 08.01.2003: опубл. 10.10.2005 / Т.И. Громовых, Ю.А. Литовка, В.С. Садыкова; заявитель Сибирский государственный технологический университет, Красноярский государственный университет. — EDN XQDRMS.
8. Патент № 2630661 С1 Российская Федерация, МПК C12N 1/20, A01N 63/02, C12R 1/465. Штамм *Streptomyces globisporus* к-35/15 в качестве средства для защиты растений от вредных насекомых-фитофагов: № 2016145887: заявл. 22.11.2016: опубл. 11.09.2017 / В.П. Ермолова, Г.В. Самоукина, С.Д. Гришечкина [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»
9. Попова Е.Д. Подбор и оптимизация питательных сред для культивирования актиномицетов — продуцентов антибиотиков / Е.Д. Попова // Международный научно-исследовательский журнал. — 2015. — № 3–2(34). — С. 11–13. — EDN TONFFX.
10. Рябова О.В. Актиномицеты как основа пробиотиков для растений / О.В. Рябова, А.А. Гагарина // Биотехнология. — 2021. — Т. 37, № 2. — С. 3–19. — DOI 10.21519/0234-2758–2021-37-2-3-19. — EDN YZDCSD.
11. Сравнительная характеристика роста и целлюлазной активности стрептомицетов на различных субстратах / И.Г. Широких, Я.И. Назарова, Н.А. Боков, Т.Я. Ашихмина // Теоретическая и прикладная экология. — 2021. — № 2. — С. 122–127. — DOI 10.25750/1995–4301–2021–2–122–127. — EDN KYQOWE.
12. Akhmedova Z. Use of SOME microbial enzymes and their compositions against phytopathogenes in agricultural areas / Z. Akhmedova, Z. Khamraeva, M. Yakhyayeva // Bulletin of Science and Practice. — 2017. — No. 12(25). — P. 35–41. — DOI 10.5281/zenodo.1101139. — EDN ZWSMPH
13. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes / R.A Usama, T. Grkovic, S. Balasubramanian et al. // Biotechnology Advances. — 2015. — Vol. 33, №6, P. 798–811.
14. Mochon A.B., Sussland D., Saubolle M.A. Aerobic Actinomycetes of Clinical Significance. Microbiol Spectr. 2016 Aug;4(4). doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0021-2015. PMID: 27726807. Robertsen H.L., Musiol-Kroll E.M. Actinomycete-Derived Polyketides as a Source of Antibiotics and Lead Structures for the Development of New Antimicrobial Drugs // Antibiotics. — 2019. Vol. 8. — №4. — P. — 157.

© Гайдашева Ирина Игоревна (gaidashevai@mail.ru); Тарасова Ирина Альбертовна (irina_tarassova@mail.ru);

Сталева София Денисовна (sofistaleva@mail.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»