

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2024.06.010>

УДК 579.26:631.427.2:632.913

Н.М. Сергійчук^{1,3}, <https://orcid.org/0000-0001-6690-0114>

Ю.В. Коломієць¹, <https://orcid.org/0000-0002-1919-6336>

Л.О. Білявська², <https://orcid.org/0000-0002-8785-4361>

Л.В. Зінченко², <https://orcid.org/0009-0006-9200-3111>

Н.А. Ілюк³, <https://orcid.org/0000-0002-3296-4790>

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, Україна

² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, Україна

³ Відкритий міжнародний університет розвитку людини “Україна”, Київ, Україна

E-mail: julyja12345@gmail.com

Вплив середовища культивування на біосинтез стеролів *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 (54)

Представлено членом-кореспондентом НАН України А.І. Ємець

Досліджено біосинтез стероїдних сполук селекціонованим ґрунтовим стрептоміцетом *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 (54) за різних умов глибинного культивування і визначено їхній вміст у біопрепаратах, розроблених на основі метаболітів цього штаму. Для аналізу дериватів стеролів, екстрагованих з біомаси, супернатантів культуральних рідин та біопрепаратів застосовано метод газової хромато-маспектрометрії. У біомасі досліджуваного стрептоміцету стероли виявлено в значно більших кількостях, ніж у супернатантів культуральних рідин, а їх спектр і співвідношення були різними. Попередник стеролів сквален виявлено в біомасі продуцента в кількості 276,3 мкг/г за умов вирощування на синтетичному середовищі і 119,4 мкг/г на органічному. У біомасі *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 (54) переважав 24-епібрасинолід, вміст якого сягав 378,1 мкг/г на органічному середовищі і 448,5 мкг/г на синтетичному. *S. avermitilis* не синтезував ситостерол і стигмастерол, що важливо з огляду на нематичидні властивості штаму. У складі метаболітних біопрепаратів найбільший загальний вміст стеролів (22,8 мг/л) виявлено в удосконаленому аверкомі. Екзогенні стероли мікробного походження відіграють важливу роль у регулюванні їхнього співвідношення в рослинах і сприяють підвищенню резистентності до фітопатогенів та фітонематод. Селекція стрептоміцетів, здатних синтезувати не лише підвищений вміст цільового продукту, а й стероли, а також створення метаболітних біопрепаратів на їх основі є перспективним напрямом у мікробній біотехнології.

Ключові слова: ґрунтові стрептоміцети, стероли, індуктори стійкості рослин, фітопатогени, фітонематоди, метаболітні біопрепарати.

Ц и т у в а н н я: Сергійчук Н.М., Коломієць Ю.В., Білявська Л.О., Зінченко Л.В., Ілюк Н.А. Вплив середовища культивування на біосинтез стеролів *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 (54). *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2024. № 6. С. 10—20. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2024.06.010>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2024. Стаття опублікована за умовами відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Вступ. Останнім часом все більша увага приділяється вивченню екологічної ролі та біосинтетичної активності ґрунтових мікроорганізмів, метаболіти яких беруть істотну участь у функціонуванні мікробних ценозів ґрунту і мікробно-рослинних взаємодіях. Важливою складовою мікробіоценозу ґрунту є актинобактерії, зокрема представники роду *Streptomyces* — продуценти широкого спектра біологічно активних речовин (БАР), які сприяють поліпшенню фітосанітарного стану ґрунту і забезпечують праймінг-ефект щодо рослин, що робить їх ключовими об'єктами для досліджень у біотехнології та створенні нових корисних продуктів [1]. Вторинні метаболіти стрептоміцетів класифікують на чотири класи: сполуки з регуляторною активністю — включають морфогенні агенти, сидерофори та фактори росту; антагоністичні засоби проти найпростіших — антибактеріальні, протигрибкові та противірусні; біопестициди, в тому числі інсектициди і гербіциди — як агробіологічні засоби; неврологічні агенти, імуномодулятори, протипухлинні та інгібітори ферментів — як фармакологічні препарати [2, 3].

Серед вторинних метаболітів стрептоміцетів важливо досліджувати не лише антибіотичні речовини, а й інші фізіологічно активні сполуки, зокрема стероли, як у природних, так і селекціонованих штаммах. Стероли є структурним елементом біологічних мембран, а також виконують важливі регуляторні функції [4]. У вищих рослин склад стеролів різноманітний [5], основними з них є β -ситостерол, стигмастерол і кампестерол, також можуть бути холестерол та ергостерол. Відомо, що стероли є попередниками рослинних гормонів брасиностероїдів, які в наднизьких концентраціях (10^{-9} — 10^{-12} М) впливають на широкий спектр клітинних реакцій рослин, підвищуючи їх адаптаційні властивості, такі як стимулювання експресії захисних генів, стійкість до хвороб, несприятливих факторів довкілля, у тому числі до негативного впливу пестицидів [5, 6]. Здатність мікроорганізмів синтезувати стероли досі недостатньо досліджено. Показано, що основним стеролом у мембранах дріжджів і міцеліальних грибів є ергостерол, який виконує ту саму роль, що і холестерол у клітинах тварин [7]. У бактерій виявлено стероли групи гопаноїдів, які впливають на проникність і пластичність мембран та інші властивості, так само, як стероли еукаріот [8]. У багатьох бактерій гопаноїди можуть брати участь у коригуванні проникності клітинних мембран, в адаптації до екстремальних умов довкілля. Вони утворюються в повітряних гіфах і спорах прокаріотичних ґрунтових бактерій роду *Streptomyces*, де допомагають мінімізувати втрати води через мембрану в повітря [8].

На сьогодні мало досліджено вплив селекції штамів не лише на синтез антибіотичних речовин — основного цільового продукту, а й на накопичення інших БАР, зокрема стеролів. Отримані знання будуть корисними для розуміння складних метаболітних взаємозв'язків у клітині стрептоміцетів і розроблення ефективних мікробних біотехнологій, де одним процесом можна регулювати накопичення практично корисних метаболітів.

Метою дослідження було вивчити біосинтез стероїдних сполук селекціонованим ґрунтовим стрептоміцетом *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 (54) за різних умов глибинного культивування і визначити їх вміст у біопрепаратах, розроблених на основі метаболітів цього штаму.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були селекціонований нами штам ґрунтового стрептоміцету *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 (54) [9] та етанольна витяжка з біомаси *S. avermitilis* УКМ Ас-2179, що є основою біопрепарату “Аверком”.

Для дослідження біосинтезу стеролів стрептоміцет вирощували в рідкому синтетичному (крохмале-аміачному) та органічному (соєвому) середовищах [10] впродовж семи

діб. Як інокулянт використовували штаб в експоненційній фазі росту, вирощений у соєвому середовищі. Кількість посівного матеріалу становила 5 % об'єму рідкого живильного середовища. Культивування проводили в колбах Ерленмеєра об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на роторних качалках ($t = 28 \pm 1$ °C; $n = 240$ об./хв) до стаціонарної фази росту. Біомасу стрептоміцету відокремлювали центрифугуванням (4000 g) впродовж 20 хв. Супернатант культуральної рідини зберігали за температури 4 °C. Для отримання етанольного екстракту до осадженої біомаси додавали 10 мл охолодженої до 4 °C дистильованої води, ретельно перемішували і центрифугували 10 хв за відцентрового прискорення 4000 g. До відмитої три–чотири рази біомаси додавали 96 %-й етанол у співвідношенні 1 : 5 і, періодично перемішуючи, проводили екстракцію за кімнатної температури впродовж 24 год, після чого відокремлювали біомасу центрифугуванням (10 хв, 4000 g). Отриманий етанольний екстракт зберігали за температури 4 °C [10]. Супернатанти культуральних рідин і етанольні екстракти біомаси стрептоміцету використовували для визначення вмісту стеролів і створення відповідних композиційних метаболітних біопрепаратів.

Визначення сполук стероїдної природи. Рідке культуральне середовище центрифугували за температури 0 °C і відцентрового прискорення 10000 g впродовж 20 хв. Екстракцію етиловим спиртом здійснювали з біомаси продуцента як описано раніше [11]. Етанольний екстракт упарювали під вакуумом за температури 45 °C. Із сухого залишку стероли тричі екстрагували сумішшю ацетонітрил/етилацетат (1 : 1 об/об). Екстракти випарювали насухо під вакуумом і проводили пробопідготовку за протоколом [11]. Попередньо підготовлені та висушені проби розчиняли в 100 мкл піридину і додавали 100 мкл реакційної суміші — *N,O*-біс(триметилсиліл)трифторацетамід/триметилхлорсилан (5/1, об/об), витримували впродовж 30 хв за температури 70 °C (проводили дериватизацію) [12]. Аналіз стероїдних сполук виконували методом газової хромато-маспектрометрії на приладі 6890N/5973inert (“Agilent Technologies”, США). Хроматографічне розділення проводили на капілярній колонці HP-5ms (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм, “J&W Scientific”, США) у градієнтному режимі. Початкову температуру 275 °C витримували впродовж 16 хв з подальшим градієнтом 20 °C/хв до 300 °C з плато 5 хв. Газ-носії — гелій, швидкість потоку через колонку — 1 мл/хв, пробу об'ємом 1 мкл вводили в режимі поділу потоку з коефіцієнтом 1 : 50. Температура випаровувача — 250 °C, інтерфейсу — 280 °C. Іонізацію проводили в режимі електронного удару з енергією в 70 eV, реєстрацію іонів здійснювали в режимі SCAN у діапазоні 50—600 *m/z*. Для фіксації і оброблення даних використовували програмне забезпечення ChemStation, досліджувані компоненти ідентифікували за допомогою бібліотеки маспектрів NIST 02 і відповідних стандартів холестеролу, ергостеролу, ситостеролу, стигмастеролу і 24-епібрасиноліду (“Sigma-Aldrich”).

Розрахунки та статистичне опрацювання отриманих результатів виконували за допомогою комп'ютерних програм *Statistica 6.0* і *Microsoft Excel '10*. Достовірність відмінностей між значеннями ($p < 0,05$) визначали в трьох незалежних експериментах ($n = 9$).

Результати дослідження та їх обговорення. Селекціонований штаб ґрунтового стрептоміцету *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 (54) [9] характеризується високою антинематодною активністю до фітонематод родів *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Pratylenchus*, *Tylenchobrynychus*, *Helicotylenchus*, *Paratylenchus*, *Heterodera* і здатністю до підвищення системної стійкості рослин, зокрема до фітопатогенних грибів родин *Alternaria*, *Fusarium* та ін. Досліджуваний штаб виявляє крім антагоністичних фітостимулювальні та адаптогенні властивості, що є перспективним для створення на його основі екологічно безпечних метаболітних біопре-

паратів для рослинництва [10]. На основі комплексу БАР, синтезованих продуцентом, розроблено поліфункціональні метаболітні біопрепарати “Аверком” та “Аверком нова”. Препарати поєднують антагоністичну активність проти фітопатогенів і фітонематод, а також властивості регуляторів росту і адаптогенів рослин [6, 10]. Аверком є етанольною витяжкою з біомаси *S. avermitilis* УКМ Ас-2179. Раніше нами було виявлено в складі розроблених метаболітних біопрепаратів антибіотичні субстанції різної хімічної природи, зокрема в аверкомі макролідні сполуки. Крім того, розроблені біопрепарати містять БАР, синтезовані продуцентами: амінокислоти, ліпіди, у тому числі фосфоліпіди, стерини, жирні кислоти, а також фітогормони (ауксини, цитокініни, гібереліни) та ін. [10, 13].

У супернатанті культуральної рідини і в біомасі досліджуваного продуцента, вирощеного в синтетичному та органічному середовищах, виявлено стероли, спектр і кількісне співвідношення яких наведено в табл. 1.

Попередник стеролів сквален визначено в супернатанті культуральної рідини в незначній кількості (від 1,41 до 3,24 мкг/мл). Значно більшим був його вміст у біомасі продуцента — 276,3 мкг/г (у разі вирощування стрептоміцету на синтетичному середовищі) і 119,39 мкг/г (на органічному середовищі).

На підставі аналізу якісного складу кінцевих продуктів стероїдогенезу можна дійти висновку, що досліджуваний штам синтезував стероли різними незалежними шляхами. Зокрема, вірогідним є окиснення сквалену до 2,3-оксидосквалену з подальшим утворенням циклічного ланостеролу, з якого синтезуються трьома незалежними шляхами ситостерол і стигмастерол (через ізофукостерол), брасиностероїд 24-епібрасинолід (через кампестерол) і ергостерол. Наявність холестеролу серед метаболітів свідчить про те, що досліджуваний стрептоміцет здатний був з 2,3-оксидосквалену утворювати інші попередники — циклоартенон, з якого синтезується кінцевий продукт холестерол.

У супернатанті культуральних рідин стероли були виявлені у значно менших кількостях порівняно з біомасою. Тобто стероли в основному накопичуються у біомасі продуцента і практично не продукуються в середовище вирощування. В біомасі *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 (54), вирощеній на синтетичному середовищі, вміст холестеролу та ергостеролу був відповідно майже у 2 та 8,5 рази меншим, ніж у вирощеній на органічному середовищі, тоді як вміст 24-епібрасиноліду, навпаки, був майже у 1,2 рази вищим. Серед стеролів, що міс-

Таблиця 1. Вміст стеролів у *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 (54)

Стероїдні сполуки	Синтетичне середовище вирощування		Органічне середовище вирощування	
	Супернатант культуральної рідини, мкг/мл	Біомаса, мкг/г АСБ	Супернатант культуральної рідини, мкг/мл	Біомаса, мкг/г АСБ
Сквален	1,41±0,03	276,3±4,32	3,24±0,36	119,39±2,73
Холестерол	0,43±0,03	138,91±3,64	1,52±0,08	271,57±5,49
Ергостерол	0,05±0,01	15,57±1,31	0,25±0,02	131,75±3,83
Ситостерол	Н. в.	Н. в.	Н. в.	Н. в.
Стигмастерол	Н. в.	Н. в.	Н. в.	Н. в.
24-Епібрасинолід	Н. в.	448,53±5,29	13,96±0,32	378,11±6,48

Примітка. АСБ — абсолютно суха біомаса; Н. в. — не виявлено.

тилися у біомасі *S. avermitilis*, переважав 24-епібрасинолід — 378,11 мкг/г (на органічному середовищі) і 448,53 мкг/г (на синтетичному). Оскільки синтез брасиностероїдів, з одного боку, і ситостеролу та стигма стеролу, з іншого, відбувається паралельними шляхами з одного попередника ланостеролу, то виявлений підвищений синтез 24-епібрасиноліду у *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 (54) може свідчити про блокування паралельного шляху.

Селекціонований нами *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 (54) характеризувався вищим вмістом стеролів на 30—40 % порівняно з вихідним штамом [14]. Тобто в результаті селекції зростає не лише синтез цільового продукту, а й інших БАР, зокрема стеролів. Це може бути пов'язано з тим, що макролідні сполуки накопичуються в основному в ліпідних фракціях продуцента. Дані щодо підвищеного синтезу стеролів досліджуваним стрептоміцетом у результаті його селекції отримані нами вперше.

Той факт, що *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 (54) не синтезує ситостерол, який є попередником синтезу стигмастеролу, є важливим з огляду на практичне використання штаму. Відомо, що домінантним стеролом у яйцях і самок фітопаразитичних нематод є стигмастерол. Гельмінти не здатні синтезувати цей стерол, а споживають його з рослин під час інвазії. Це обумовлює можливість існування та розмноження паразитів і ступінь реалізації їх видового біологічного потенціалу [14]. Таким чином, відсутність ситостеролу і стигмастеролу стримує розмноження нематод.

Отже, супернатант культуральної рідини і біомаса селекціонованого нами штаму містять значну кількість стероїдних сполук, які мають важливе практичне значення і можуть бути використані у рослинництві.

Слід зазначити, що останнім часом все більше дослідників дотримуються думки про те, що ізопреноїдні сполуки виступають не тільки як регулятори росту та розвитку рослин, але також відіграють важливу роль у формуванні рослинного імунітету, зокрема впливають на синтез етилену, саліцилової і жасмонової кислот та ін. [14]

Як вже зазначалося, селекціонований нами штам *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 (54) характеризується комплексом практично корисних властивостей, а саме антагонізмом до фітопатогенів, стимулювальною і протекторною дією на рослини.

Препарат “Аверком”, отриманий із селекціонованого нами продуцента, характеризувався не лише вищим вмістом макролідних сполук, а й стеролів. Загальний вміст стеролів в удосконаленому “Аверкомі” порівняно з вихідним препаратом збільшився у 2,4 раза (табл. 2).

Таблиця 2. Вміст стеролів у біопрепаратах “Аверком” залежно від біосинтетичної здатності продуцента, мг/л

Стероли	“Аверком”	“Аверком” удосконалений
Сквален	0,17 ± 0,06	0,51 ± 0,08
Холестерол	1,69 ± 0,33	3,72 ± 0,48
Ергостерол	2,13 ± 0,39	4,05 ± 0,51
Ситостерол	Н. в.	Н. в.
Стигмастерол	Н. в.	Н. в.
24-Епібрасинолід	5,66 ± 0,69	14,15 ± 1,25
Загальний вміст	9,65 ± 0,78	22,79 ± 1,19

Примітка. Н. в. — не виявлено.

На нашу думку, використання біопрепаратів, що містять екзогенні стероли мікробного походження, може змінювати їх баланс у рослині, що, без сумніву, має важливе значення у взаємовідношенні рослина-господар і патоген, і може впливати на ступінь стійкості рослин до фітопатогенів.

Роль екзогенних стероїдних сполук слід розглядати на підставі сучасних уявлень про структуру та функції ліпідних компонентів у мембранах рослинної клітини, а також їх можливих сигнальних функцій.

В останні роки в структурі ліпідних компонентів біологічних мембран виявлено дискретні утворення — мікродомени, які відрізняються від основної частини мембрани вищим вмістом стеролів, сфінголіпідів і фосфоліпідів, а також насичених жирних кислот [15]. Ці мікродомени дістали назву ліпідні рафти (від англ. *raft* — пліт). Рафти тісно пов'язані зі специфічними білками, утворюючи субкомпартментну дискретну структуру мембран. Протеомним аналізом цих мікродомени визначено специфічні білки, пов'язані з сигналінгом і транспортом [16]. Рафти виявлено в мембранах ссавців, рослин і дріжджів [15]. Нещодавно було встановлено, що у бактерій, зокрема стрептоміцетів, є функціонально організовані мембранні мікродомени, які еквівалентні ліпідним рафтам у еукаріот [17]. Розміри рафтів коливаються від нано- до мікродоменив [17, 18].

Ліпіди рафтів і стероїдні гормони тісно зв'язані як у рослинній, так і в бактеріальній клітинах. Наприклад, в моношарі холестерол може взаємодіяти зі сфінголіпідними компонентами рафтів. За даними [18], ліпідні рафти тютюну поряд зі сфінгостеролами містять холестерол, ситостерол, стигмастерол і 24-метилхолестерол. Отже, зміни вмісту стеролів і їх похідних, які залежать від ендогенної концентрації стероїдних гормонів, можуть змінювати властивості та кількість ліпідних рафтів, а також їх функціональну активність. Показано, що стероли, синтезовані в клітині, швидко транспортуються до плазматичної мембрани [5, 19].

У рослинних клітинах рафти беруть участь у різних фізіологічно важливих процесах, таких як везикулярний обмін, резистентність до патогенів, гравічутливість, регуляція діяльності іонних каналів [15, 18]. Не менш важлива роль рафтів у сигналінгу, відповідях на біотичні та абіотичні стреси, метаболізмі клітинної оболонки. Тобто ліпідні рафти є сигнальною платформою, яка бере участь в зазначених вище процесах. Загалом виявлення ліпідних рафтів у бактерій розкриває новий рівень складності в передачі сигналу та організації їх мембран і свідчить про те, що бактерії є складнішими, ніж передбачала попередня оцінка [17].

Слід зазначити, що синтез ендогенних стероїдних гормонів у клітині регулюється системою генів, що запускають або репресують цей процес [5, 19]. Так, два рослинних стероли — кампестерол і його епімер є попередниками синтезу брасиностероїдів [5]. Надмірно висока або, навпаки, занадто низька концентрація брасиностероїдів у клітині може впливати на експресію генів синтезу стеролів, зменшуючи або збільшуючи вміст прекурсорів і тим самим контролюючи швидкість біосинтезу брасиностероїдів [5, 20]. Крім того, зміна експресії зазначених генів також впливає на вміст інших стеролів — ситостеролу і стигмастеролу [5, 20].

Зміни кількості і складу стеролів у рослинній клітині можуть визначати властивості і кількість ліпідних рафтів і в такий спосіб опосередковано впливати на стеролзв'язані мембранні рецептори. Крім того, експресія генів біосинтезу стеролів бере участь у перехресній сигналінговій мережі взаємодії з іншими фітогормонами [15, 18].

Дослідження на мутантах *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, дефектних за синтезом стеролів, показали, що взаємодія між стеролами, сфінголіпідами і білками необхідна для формування і підтримки мембранного субкомпартмента у вигляді мікродоменів. Глікозилювання ліпідів (стеролів, керамідів, сфінголіпідів) може слугувати додатковим фактором, що регулює стан мікродоменів [21]. Результати багатьох досліджень свідчать про те, що рослинні стероли функціонують не тільки як мембранні компоненти, але також як сигнальні молекули для росту і розвитку рослин, особливо в стадії ембріогенезу [22, 23].

В умовах біотичних і абіотичних стресів, а також антропогенного впливу на агросистеми складна схема регуляції підтримки збалансованого вмісту стероїдних фітогормонів може бути порушена. Відомо, що деякі фунгіциди, які містять триазольні, імідазольні і піримідинові групи, інгібують синтез стеролів [22]. У цьому разі рослина матиме потребу в додаткових екзогенних стеролах, що зумовлює використання препаратів, які їх містять. Можна висловити припущення, що використання препаратів, які містять мікробні стероли, сприятиме підвищенню резистентності рослин до фітопатогенів. У наших дослідженнях це припущення було підтверджено в польових дослідах з рослинами пшениці, томатів, пекінської капусти та ін. Застосування екзогенних стеролів у комплексі з іншими біологічно активними компонентами, що входять до складу біопрепаратів, сприяло підвищенню резистентності рослин до широкого спектра збудників кореневих гнилей, фузаріозів, фітофторозів, нематодозів і, як наслідок, зростанню урожаю та покращенню якості отримуваної продукції [6, 11].

Висновки. У біомасі селекціонованого штаму *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 (54) стероли виявлено в значно більшій кількості, ніж у супернатанті культуральної рідини. Вміст сквалену в біомасі продуцента становив $276,3 \pm 4,32$ мкг/г за умов вирощування на синтетичному середовищі і $119,39 \pm 2,73$ мкг/г на органічному середовищі. У біомасі *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 (54) переважав 24-епібрасинолід, вміст якого був найвищим і сягав $378,11 \pm 6,48$ мкг/г (на органічному середовищі) та $448,53 \pm 5,29$ мкг/г (на синтетичному середовищі). *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 (54) не синтезував ситостерол і стигмастерол, що суттєво з огляду на нематоцидні властивості штаму. В удосконаленому біопрепараті “Аверком” загальний вміст стеролів був вищим у 2,4 раза. Застосування метаболічних біопрепаратів, розроблених на основі БАР селекціонованого стрептоміцету, що містять стероли мікробного походження, важливе для регулювання стероїдного пулу в рослинах і підвищення їх стійкості до фітопатогенів та абіотичних стресів, зокрема до негативного впливу пестицидів. Пошук стрептоміцетів, здатних синтезувати стероли, та їх селекція, а також створення метаболічних біопрепаратів на їх основі є перспективним напрямом у мікробній біотехнології.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Lacey H.J., Rutledge P.J. Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species. *Molecules*. 2022. **27**, № 3. 887. <https://doi.org/10.3390/molecules27030887>
2. Saito S., Arai M.A. Methodology for awakening the potential secondary metabolic capacity in actinomycetes. *Beilstein J. Org. Chem.* 2024. **20**. P. 753—766. <https://doi.org/10.3762/bjoc.20.69>
3. Cao P., Li C., Wang H., Yu Z., Xu X., Wang X., Zhao J., Xiang W. Community structures and antifungal activity of root-associated endophytic actinobacteria in healthy and diseased cucumber plants and *Streptomyces* sp. HAAG3-15 as a promising biocontrol agent. *Microorganisms*. 2020. **8**, № 2. 236. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020236>
4. Rohmer M., Khani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* 1993. **295**, № 2. P. 517—524. <https://doi.org/10.1042/bj2950517>
5. Zhabinskii V.N., Khripach N.B., Khripach V.A. Steroid plant hormones: effects outside plant kingdom. *Steroids*. 2015. **97**. P. 87—97. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.025>
6. Biliavska L.O., Tsygankova V.A., Kozyriska V.E., Iutynska G.O., Andrushevich Ya.V., Babich O.A., Galkin A.P., Blume Ya.B. Application of new microbial plant resistance/plant growth protection inducers for increasing Chinese cabbage plant tolerance against parasitic nematode *Heterodera schachtii* Schmidt. *Int. J. Res. Biosci.* 2016. **5**, № 2. P. 64—82.
7. Dupont S., Lemetais G., Ferreira T., Cayot P., Gervais P., Beney L. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution*. 2012. **66**, № 9. P. 2961—2968. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x>
8. Sáenz J.P., Sezgin E., Schwiller P., Simons K. Functional convergence of hopanoids and sterols in membrane ordering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. **109**, № 35. P. 14236—14240. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212141109>
9. Сергійчук Н.М., Білявська Л.О., Коломієць Ю.В., Зінченко Л.В., Ілюк Н.А. Вплив N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину на авермектинсинтезуючу здатність *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 та появу ауксотрофних мутантів. *Біологічні системи: теорія та інновації*. 2024. **15**, № 2. С. 5—16. [https://doi.org/10.31548/biologiya15\(2\).2024.001](https://doi.org/10.31548/biologiya15(2).2024.001)
10. Iutynska G.O., Biliavska L.O., Kozyriska V.E. Development strategy for the new environmentally friendly multifunctional bioformulations based on soil streptomycetes. *Microbiol. Z.* 2017. **79**, № 1. P. 22—33. <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.01.022>
11. Kamthan A., Kamthan M., Chakraborty N., Chakraborty S. Datta A. A simple protocol for extraction, derivatization, and analysis of tomato leaf and fruit lipophilic metabolites using GC-MS. *Protocol Exchange*. 2012. <https://doi.org/10.1038/protex.2012.061>
12. Orata F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. *Advanced gas chromatography — Progress in agricultural, biomedical and industrial applications*: Mohd M.A. (Ed.). Rijeka: InTech, 2012. P. 83—108.
13. Білявська Л.О., Козирицька В.Є., Коломієць Ю.В., Бабич О.Г., Іутинська Г.О. Фітозахисні та рістрегулювальні властивості метаболічних препаратів на основі ґрунтових стрептоміцетів. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2015. № 1. С. 131—137. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2015.01.131>
14. Biliavska L.O., Ostapchuk A.M., Voychuk S.I., Iutynska G.O. Sterol biosynthesis by soil streptomycetes. *Ukr. Biochem. J.* 2017. **89**, № 2. P. 78—84. <https://doi.org/10.15407/ubj89.02.078>
15. Borner G.H.H., Sherrier D.J., Weimar T., Michaelson L.V., Hawkins N.D., MacAskill A., Napier J.A., Beale M.H., Lilley K.S., Dupree P. Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* 2005. **137**, № 1. P. 104—116. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053041>
16. Kierszniowska S., Seiwert B., Schulze W.X. Definition of *Arabidopsis* sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl- β -cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*. 2009. **8**, № 4. P. 612—623. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800346-MCP200>
17. Bramkamp M., Lopez D. Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015. **79**, № 1. P. 81—100. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-14>
18. Cacas J.-L., Furt F., Le Guédard M., Schmitter J.-M., Buré C., Gerbeau-Pissot P., Moreau P., Bessoule J.-J., Simon-Plas F., Mongrand S. Lipids of plant membrane rafts. *Prog. Lipid Res.* 2012. **51**, № 3. P. 272—299. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.04.001>

19. López D., Kolter R. Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev.* 2010. **24**, № 17. P. 1893—1902. <https://doi.org/10.1101/gad.1945010>
20. Tanaka K., Nakamura Y., Asami T., Yoshida S., Matsuo T., Okamoto S. Physiological roles of brassinosteroids in early growth of *Arabidopsis*: Brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation. *J. Plant Growth Regul.* 2003. **22**. P. 259—271. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0119-3>
21. Zaubner H., Burgos A., Garapati P., Schulze W.X. Plasma membrane lipid–protein interactions affect signaling processes in sterol-biosynthesis mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 2014. **5**. 78. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00078>
22. Wang K., Senthil-Kumar M., Ryu C.-M., Kang L., Mysore K.S. Phytosterol play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiol.* 2012. **158**, № 4. P. 1789—1802. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189217>
23. Griebel N., Zeier J. A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *Plant J.* 2010. **63**, № 2. P. 254—268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04235.x>

Надійшло до редакції 17.10.2024

REFERENCES

1. Lacey, H. J. & Rutledge, P. J. (2022). Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species. *Molecules*, 27, No. 3, 887. <https://doi.org/10.3390/molecules27030887>
2. Saito, S. & Arai, M. A. (2024). Methodology for awakening the potential secondary metabolic capacity in actinomycetes. *Beilstein J. Org. Chem*, 20, pp. 753-766. <https://doi.org/10.3762/bjoc.20.69>
3. Cao, P., Li, C., Wang, H., Yu, Z., Xu, X., Wang, X., Zhao, J. & Xiang, W. (2020). Community structures and antifungal activity of root-associated endophytic actinobacteria in healthy and diseased cucumber plants and *Streptomyces* sp. HAAG3-15 as a promising biocontrol agent. *Microorganisms*, 8, No. 2, 236. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020236>
4. Rohmer, M., Khani, M., Simonin, P., Sutter, B. & Sahn, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.*, 295, No. 2, pp. 517-524. <https://doi.org/10.1042/bj2950517>
5. Zhabinskii, V. N., Khripach, N. B. & Khripach, V. A. (2015). Steroid plant hormones: effects outside plant kingdom. *Steroids*, 97, pp. 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.025>
6. Biliavska, L. O., Tsygankova, V. A., Kozyriska, V. E., Iutynska, G. O., Andrusevich, Ya.V., Babich, O. A., Galkin, A. P. & Blume, Ya. B. (2016). Application of new microbial plant resistance/plant growth protection inducers for increasing Chinese cabbage plant tolerance against parasitic nematode *Heterodera schachtii* Schmidt. *Int. J. Res. Biosci.*, 5, No. 2, pp. 64-82.
7. Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P. & Beney L. (2012). Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution*, 66, No. 9, pp. 2961-2968. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x>
8. Sáenz, J. P., Sezgin, E., Schwille, P. & Simons, K. (2012). Functional convergence of hopanoids and sterols in membrane ordering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, No. 35, pp. 14236-14240. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212141109>
9. Serhiychuk, N., Biliavska, L., Kolomiets, Yu., Zinchenko, L. & Ilyuk, N. (2024). The influence of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on avermectin synthesis ability of *Streptomyces avermitilis* UKM As-2179 and appearing auxotrophic mutants. *Biological systems: theory and innovation*, 15, No. 2, pp. 5-16 (in Ukrainian). [https://doi.org/10.31548/biologiya15\(2\).2024.001](https://doi.org/10.31548/biologiya15(2).2024.001)
10. Iutynska, G. O., Biliavska, L. O. & Kozyriska, V. E. (2017). Development strategy for the new environmentally friendly multifunctional bioformulations based on soil streptomycetes. *Microbiol. Z.*, 79, No. 1, pp. 22-33. <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.01.022>
11. Kamthan, A., Kamthan, M., Chakraborty, N., Chakraborty, S. & Datta, A. (2012). A simple protocol for extraction, derivatization, and analysis of tomato leaf and fruit lipophilic metabolites using GC-MS. *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/protex.2012.061>

12. Orata, F. (2012). Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. In Mohd M. A. (Ed.), *Advanced gas chromatography — Progress in agricultural, biomedical and industrial applications* (pp. 83-108), Rijeka: InTech.
13. Biliavska, L. O., Kozyriska, V. E., Kolomiets, Yu. V., Babich, A. G. & Iutynska, G. O. (2015). Phytoprotective and growth-regulatory properties of metabolic bioformulations on the base of soil streptomycetes. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 1, pp. 131-137 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15407/dopovidi2015.01.131>
14. Biliavska, L. O., Ostapchuk, A. M., Voychuk, S. I. & Iutynska, G. O. (2017). Sterol biosynthesis by soil streptomycetes. *Ukr. Biochem. J.*, 89, No. 2, pp. 78-84. <https://doi.org/10.15407/ubj89.02.078>
15. Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., MacAskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S. & Dupree, P. (2005). Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.*, 137, No. 1, pp. 104-116. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053041>
16. Kierszniowska, S., Seiwert, B. & Schulze, W. X. (2009). Definition of *Arabidopsis* sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl- β -cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, 8, No. 4, pp. 612-623. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800346-MCP200>
17. Bramkamp, M. & Lopez, D. (2015). Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 79, No. 1, pp. 81-100. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-14>
18. Cacas, J.-L., Furt, F., Le Guédard, M., Schmitter, J.-M., Buré, C., Gerbeau-Pissot, P., Moreau, P., Bessoule, J.-J., Simon-Plas, F. & Mongrand, S. (2012). Lipids of plant membrane rafts. *Prog. Lipid Res.*, 51, No. 3, pp. 272-299. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.04.001>
19. López, D. & Kolter, R. (2010). Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev.*, 24, No. 17, pp. 1893-1902. <https://doi.org/10.1101/gad.1945010>
20. Tanaka, K., Nakamura, Y., Asami, T., Yoshida, S., Matsuo, T. & Okamoto, S. (2003). Physiological roles of brassinosteroids in early growth of *Arabidopsis*: Brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation. *J. Plant Growth Regul.*, 22, pp. 259-271. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0119-3>
21. Zuber, H., Burgos, A., Garapati, P. & Schulze, W. X. (2014). Plasma membrane lipid-protein interactions affect signaling processes in sterol-biosynthesis mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.*, 5, 78. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00078>
22. Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C.-M., Kang, L. & Mysore, K. S. (2012). Phytosterol play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiol.*, 158, No. 4, pp. 1789-1802. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189217>
23. Griebel, N. & Zeier, J. (2010). A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *Plant J.*, 63, No. 2, pp. 254-268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04235.x>

Received 17.10.2024

N.M. Serhiichuk^{1,3}, <https://orcid.org/0000-0001-6690-0114>

J.V. Kolomiets¹, <https://orcid.org/0000-0002-1919-6336>

L.O. Biliavska², <https://orcid.org/0000-0002-8785-4361>

L.V. Zinchenko², <https://orcid.org/0009-0006-9200-3111>

N.A. Iluk³, <https://orcid.org/0000-0002-3296-4790>

¹ National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

² D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³ Open International University of Human Development “Ukraine”, Kyiv, Ukraine

E-mail: julyja12345@gmail.com

INFLUENCE OF SELECTION ON STEROL BIOSYNTHESIS

STREPTOMYCES AVERMITILIS UCM Ac-2179 (54)

Studies of sterol synthesis by soil streptomyces avermitilis are few and relevant, especially in the aspect of biotechnology for obtaining valuable products of microbial synthesis. The aim of this work was to study the biosynthesis of steroidal compounds by soil *Streptomyces avermitilis* UCM Ac-2179 (54) under different cultivation conditions during deep cultivation and to determine their content in biological preparations developed on the basis of metabolites of the strain under study. Sterol derivatives isolated from biomass, supernatants of culture fluids and biological preparations were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. In the biomass of the Streptomyces under study, sterols were detected in significantly higher amounts than in the supernatants of culture fluids, and their spectrum and ratio differed. The precursor of sterols, squalene, was found in the biomass of the producer in amounts of 276,3 µg/g when grown on synthetic and 119,4 µg/g on organic media. The biomass of *S. avermitilis* was dominated by 24-epibrasinolide, the content of which reached 378,1 µg/g on organic and 448,5 µg/g on synthetic media. *S. avermitilis* did not synthesize sitosterol and stigmasterol, which is important, given the strain's nematicidal properties. In the composition of metabolic biological preparations, the highest total content of sterols (9,5 mg/l) was found in the improved Averkom. The use of exogenous sterols of microbial origin is important for regulating their ratio in plants and increasing resistance to phytopathogens and phytonematodes. Selection of streptomyces capable of synthesizing not only an increased content of the target product, but also sterols, as well as the creation of metabolic biological drugs on their basis, is a promising direction in microbial biotechnology.

Keywords: soil streptomyces, sterols, inductors of plant resistance, phytopathogens, phytonematodes, metabolic bioformulatio.