



## АКТИНОБАКТЕРІЇ ОБРОСТАННЯ ТВЕРДИХ СУБСТРАТІВ ОДЕСЬКОЇ ЗАТОКИ ЧОРНОГО МОРЯ

**Страшнова І.В.** – к.т.н., с.н.с.

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, [fabiyanska@ukr.net](mailto:fabiyanska@ukr.net)

**Коротаєва Н.В.** – к.б.н., н.с.

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

**Потапенко К.С.** – аспірант

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

**Васильєва Н.Ю.** – к.б.н., с.н.с.

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

**Чабан М.М.** – інженер

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

**Штеніков М.Д.** – к.б.н., н.с.

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

**Лісютін Г.В.** – м.н.с.

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

**Іваниця В.О.** – член-кор. НАНУ, д.б.н., проф.

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

Дослідження діяльності та взаємодії морських мікроорганізмів з іншими організмами забезпечують розуміння функціонування біогеохімічних процесів, харчових ланцюгів і симбіозу. У членів морського мікробіому є також корисні властивості, які можуть бути використані для пошуку та виробництва нових продуктів і розробки нових процесів у галузі морської біотехнології. Особливо перспективними в цьому аспекті є представники актинобактерій, виділені із різноманітних джерел морського середовища. Мета роботи – ізолювати актинобактерії із біологічних обростань підводних бетонних споруд і природного черепашнику Одеської затоки, визначити їх основні біологічні властивості та біологічну різноманітність. У результаті із обростань черепашнику і бетонних поверхонь виділено відповідно 20 і 19 штамів актинобактерій, що характеризувалися морфологічною варіабельністю у рості на поживних середовищах (МПА, ВА, ККА, ISP-1–ISP-6), формуючи субстратний і повітряний міцелії. Деякі штами синтезували водорозчинні і меланоїдні пігменти на відповідних середовищах. Більшість штамів добре росли у присутності NaCl у концентрації, меншій 9%, причому штами, виділені із обростань бетону, є стійкішими до цього хімічного агенту. Ізольовані штами утилізували різні вуглецеві субстрати, демонструючи значну метаболічну активність і спроможність. Найбільш вживаним субстратом для всіх виділених штамів була лактоза, найменш придатним – ксилоза (лише 35,0% штамів, виділених із черепашнику, і 21,6% штамів із обростань бетону метаболізували цей вуглевод). Попередня ідентифікація виділених штамів актинобактерій за визначенням спектрів жирних кислот дозволила встановити, що майже всі вони є представниками роду *Streptomyces*. Отже, вперше з Одеської затоки Чорного моря ізолювано актинобактерії, охарактеризовано морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні властивості отриманих штамів, попередньо визначено їх таксономічний склад та перспективи використання для пошуку продуцентів біологічно активних сполук.

**Ключові слова:** Чорне море, Одеська затока, біологічні обростання, актинобактерії, біологічні властивості.

### Вступ

Наприкінці двадцятого століття морська мікробіологія стала галуззю морських досліджень, яка стрімко розвивається. Нові інструменти і методи

молекулярної біології і біоінформатики привели до дивовижних відкриттів багатства і різноманітності морського мікробіому і його ролі в екології моря в глобальному масштабі. Дослідження взаємодії

морських мікробів з іншими організмами забезпечують розуміння функціонування біогеохімічних процесів, харчових ланцюгів і симбіозу. Нарешті, у морських мікроорганізмів є такі корисні властивості, як виробництво нових корисних біологічно активних метаболітів, які можна використати у сфері блакитної біотехнології для потреб людини.

Останніми роками спостерігається зростання наукового інтересу до вивчення морських мікроорганізмів, оскільки морське середовище є не досить використаним джерелом для виділення нових мікроорганізмів, здатних продукувати активні вторинні метаболіти. Серед таких мікроорганізмів особливий інтерес викликають актинобактерії, оскільки відомо, що вони продукують хімічно різноманітні сполуки з широким спектром біологічної активності (Sathiyaseelan and Saranraj 2016; Maria, Sharmili and Anbumalarnathi 2018; Subramani and Sipkema 2019).

Незважаючи на те, що актинобактерії можуть бути виділені із різних об'єктів морського середовища, чисельність їх там незначна, більшість із них погано ростуть на поживних середовищах у лабораторних умовах. Таксономічне положення майже половини колекції актинобактерій морського походження не можна визначити навіть до рівня роду, що підтверджує оригінальність їх популяцій (Ward and Bora 2006).

Існує небезпідставна думка, що морські актинобактерії потрапляють у море із суші і знаходяться там у вигляді метаболічно неактивних спор. Тому вивчення вторинних метаболітів актинобактерій, виділених з моря, часто призводить до виявлення раніше відомих сполук, описаних як метаболіти наземних актиноміцетів (Dhakal et al. 2017). Проте, за даними багатьох авторів, у автохтонних морських актинобактерій метаболіти з новими структурами виявляються досить часто (Subramani and Aalbersberg 2012; Manivasagan et al. 2013; Ettoumia et al. 2016).

У цьому відношенні з урахуванням еколого-геохімічних особливостей Чорне море є унікальним. Тому виявлення і виділення актиноміцетів із об'єктів Чорного моря сприятиме вивченню екологічної ролі актинобактерій у морському середовищі, їх різноманітності, розподілу, умов культивування та еволюційних механізмів пристосування до життя в морі. Ці аспекти біології морських актиноміцетів повинні бути зрозумілі для того, щоб повніше оцінити потенціал цих бактерій до продукції нових біологічно активних метаболітів.

**Мета роботи** – ізолювати актинобактерії із біологічних обростань бетонних споруд і природного черепашнику Одеської затоки, визначити їх основні біологічні властивості та біологічну різноманітність.

#### **Матеріали та методи досліджень**

Матеріалом для дослідження були проби обростань природного черепашнику (6 зразків)

і бетонних поверхонь (7 зразків), зібрані на глибині 0,2–1,0 м у червні–липні 2020 р. в Одеській затоці Чорного моря в районі Гідробіологічної станції Одеського національного університету імені І.І. Мечникова (Одеса, Україна, 46°27'01''N 30°46'14''E). Зразки проб збирали шляхом зіскобу стерильним скальпелем біологічного обростання зазначених поверхонь та поміщали у стерильний посуд. Перед посівом на щільні поживні середовища проби поміщали у стерильну морську воду (100 мл) у колбах і струшували на шейкері (New Brunswick; режим 150 об/хв, 28°C, 30 хв.). Отримані суспензії в одному варіанті перед посівом прогрівали за температури 50°C впродовж 15 хв., в іншому – посів здійснювали без термічної обробки. Для посіву суспензії об'ємом 0,1 мл рівномірно розподіляли по поверхні поживного середовища.

Для ізоляції актинобактерій використано такі поживні середовища, як: Гаузе 2, Чапека, Ешбі, крохмаль-аміачний і ґрунтовий агарі (Білявська 2018). Усі середовища готували на морській воді і добавляли антибіотик налідиксову кислоту у концентрації 10 мг/л для запобігання росту супутньої мікробіоти. Посіви на всі середовища здійснювали у 3 повторах. Інкубацію проводили за температури 28°C упродовж 14–21 доби.

Наявність росту актинобактерій визначали візуально, відзначаючи колонії з типовим міцелієм (субстратним і повітряним), або колонії, які мали складчасту поверхню. Також враховували пігментацію поживного середовища і колоній.

Колонії, характерні для актинобактерій, відсівали і субкультивували на таких середовищах, як: Гаузе 2, вівсяний агар (ВА) і крохмаль-казеїновий агар (ККА), доводячи до стану чистої культури. Інкубацію проводили за температури 28°C протягом 7–10 діб. Чисті ізоляти зберігали за температури 4°C до подальшого використання.

У отриманих ізолятах вивчали морфологічні, фізіологічні, біохімічні та хемотаксономічні властивості:

- морфологію і характер росту досліджували на середовищах м'ясо-пептонний агар (МПА), Гаузе 2, ВА, ККА і на середовищах ISP (ISP-1–ISP-7), відповідно до Міжнародного проекту *Streptomyces* (ISP) (Shirling and Gottlieb 1966), протягом 14–21 доби за 28°C;

- синтез меланоїдних пігментів досліджували на середовищах ISP-6 і ISP-7, культивуючи протягом 14–21 доби за 28°C;

- морфологію клітин вивчали у разі мікроскопії фіксованих препаратів, забарвлених водним розчином фуксину (світловий мікроскоп, x1500);

- відношення до хлориду натрію (NaCl) визначали на середовищі МПА з різними концентраціями

NaCl (1,0; 2,0; 5,0; 7,0; 9; 12,0%). Інкубацію проводили впродовж 14 діб за 28°C. Наявність росту реєстрували візуально;

– утилізацію джерел вуглецю досліджували на мінімальному середовищі ISP 9. Джерелами вуглецю слугували глюкоза, фруктоза, галактоза, гліцерол, лактоза та ксилоза, рамноза, манітол, сорбітом, маноза, арабіноза і цукроза, які додавали окремо до розплавленого мінімального середовища, що не містить вуглеводів, для отримання кінцевої концентрації 1% і розливали у стерильні чашки Петрі. Після застигання середовищ здійснювали посів отриманих ізолятів. Інкубацію проводили протягом 14–21 доби за 28°C. Ріст штамів на різних джерелах вуглецю оцінювали як «добрий», «помірний» і «поганий» (Anderson and Wellington 2001; Валагурова, Козырицкая и Иутинская 2003);

– визначення вмісту жирних кислот проводили згідно з MIS Operating Manual. Для аналізу спектрів жирних кислот актинобактерії вирощували у 20 мл середовища Tryptic soy broth за 28°C та 150 об/хв. упродовж 3 діб.

Для ідентифікації досліджуваних штамів за порівняння спектрів жирних кислот використовували бібліотеку Sherlock Microbial Identification System (MIDI Sherlock version 6.2, MIDI database ACTIN6) (Sasser 2006; MIS ... 2012).

Усі дослідження проведено в трьох повторях. Кластеризацію сукупних культуральних, фізіологічних та біохімічних даних здійснювали за допомогою функції *rect.hclust*, яка дозволяє виділити статистично значущі кластери.

#### Результати та обговорення

Із обростань черепашнику було виділено 20 (Lim 2.1, Lim 2.2 ... Lim 12.3), а із обростань бетонних поверхонь 19 (Conc 19, Conc 20 ... Conc 44) ізолятів актинобактерій. Найбільше актинобактерій виростало на орга-

нічному середовищі Гаузе 2. У разі посівів зразків проб на щільні середовища Чапека, Ешбі, крохмаль-аміачний і ґрунтовий агари актинобактерії майже не росли (на чашках були виявлені поодинокі колонії).

Декількаразові пересиви на МПА, вівсяний агар (ВА), Гаузе 2 і крохмаль-казеїновий агар (ККА) дали змогу отримати чисті культури виділених ізолятів і вивчити культурально-морфологічні властивості. Ізольовані актинобактерії характеризувалися різноманітною морфологією колоній, що залежала не тільки від складу середовищ і віку культур, а й зумовлена плеоморфізмом (включаючи морфологічну варіабельність) видів актинобактерій, у тому числі гетерогенністю популяції у середині одного виду. На рис. 1 продемонстровано відмінності в морфології колоній штаму Lim 7.1 на різних за складом поживних середовищах.

У таблиці 1 як приклад наведено морфологічні ознаки колоній штаму Lim 3.3, виділеного із обростань черепашнику, і штаму Conc 42, виділеного із обростань бетонних поверхонь.

Відомо, що багатьом представникам мікросвіту властивий плеоморфізм, виняток не становлять і актинобактерії, які у разі росту на поживних середовищах демонструють значну різноманітність структурних характеристик колоній. Так, деякі автори (Yanti, Setyawati and Kurniatuhadi 2019) зазначають, що актиномицети, виділені з мангрового осаду, ростуть на середовищах різного складу, утворюючи різноманітні колонії, що відрізняються повітряним міцелієм, краєм і висотою субстратного міцелію, кольором зрілої спори, наявністю ексудату, пігментами та текстурою колоній. Про плеоморфізм актинобактерій ідеться і в повідомленні Е. Jayashanth (2015), в якому автор детально описує морфологічні варіанти різних представників актинобактерій.

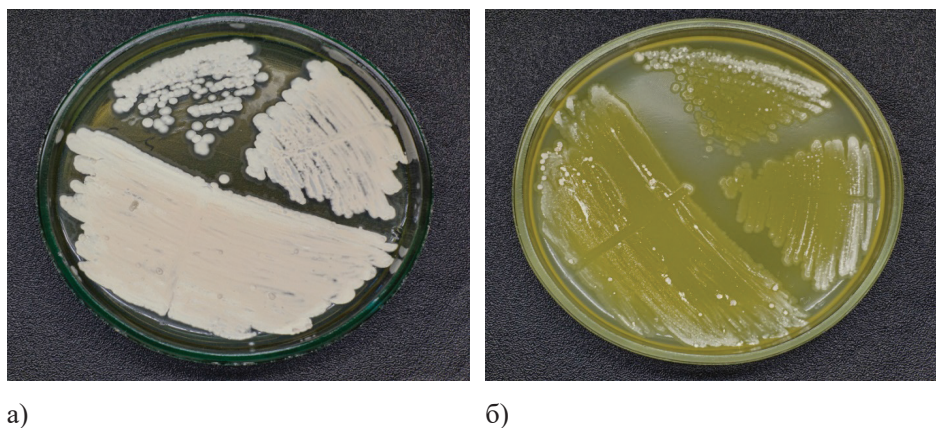


Рис. 1. Колонії актинобактерій штаму Lim 7.1 на:  
а) МПА; б) вівсяному агарі

Таблиця 1

**Ознаки колоній ізолятів актинобактерій**

Середовище	Lim 3.3	Сonc 42
МПА	Бежеві колонії з білувато-бежевим повітряним міцелієм	Колонії бежевого кольору із темно-сірим повітряним міцелієм
ВА	Темно-бежеві колонії з коричневою пігментацією колоній і середовища	Колонії світло бежевого кольору із темно-сірим повітряним міцелієм
Гаузе 2	Світло-бежеві колонії з білувато-бежевим повітряним міцелієм	Колонії темно-бежевого кольору із темно-сірим повітряним міцелієм
ККА	Темно-бежеві колонії із сіруватою пігментацією повітряного міцелію	Колонії темно-коричневого кольору із темно-сірим повітряним міцелієм

Зауважимо, що колонії деяких штамів, які утворили субстратний міцелій, легко знімаються з поживних середовищ, інші – міцно врастають в агарове середовище.

Під час дослідження росту і ознак колоній актиноміцетів із використанням середовищ ISP відзначено ріст більшості штамів, ізольованих з обростань черепашику, на всіх використаних середовищах (табл. 2).

Таблиця 2

**Характеристика росту штамів актиноміцетів, ізольованих із обростань з черепашику на середовищах ISP**

Штам	ISP-1	ISP-2	ISP-3	ISP-4	ISP-5	ISP-6	ISP-7	ISP-9
Lim 2.1	+	+	±	+	+	-	+	+
Lim 2.2	+	+	±	+	+	-	+	+
Lim 3.1	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 3.2	+	+	+	+	+	-	+	+
Lim 3.3	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 3.4	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 4	+	+	±	+	+	-	+	+
Lim 5.1	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 5.2	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 6.1	+	+	+	+	+	±	+	+
Lim 6.2	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 7.1	±	±	±	+	+	-	+	-
Lim 7.2	+	±	±	+	+	-	+	+
Lim 9.1	+	+	+	+	+	-	+	+
Lim 9.2	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 10	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 12.1	+	+	+	+	+	-	+	+
Lim 12.2	+	+	+	+	+	+	+	+
Lim 12.3	+	+	+	+	+	-	+	+
Lim Sb	+	+	+	+	+	-	+	+

Примітка: «+» – наявність цільного росту; «+» – слабкий ріст; «-» – відсутність росту; \* – здатність утворювати водорозчинний пігмент; \*\* – здатність утворювати меланоїдні пігменти.

Однак деякі штами виявились досить примхливими. Зокрема, йдеться про штами Lim 7.1 та Lim 7.2, ріст яких на середовищах ISP-1, ISP-2 і ISP-3 був бідним та спостерігався із затримкою, незважаючи на те, що ці середовища є повноцінними і рекомендуються для культивування актиноміцетів (Qinyuan Li et al. 2016; Maria, Sharmili and Anbumalarnathi 2018). Цей факт свідчить про те, що специфічні умови морського середовища впливають на фізіологію актинобактерій. Водночас на базовому середовищі ISP-9 досить активний ріст реєстрували для всіх штамів, крім Lim 7.1.

На ISP середовищах спостерігали різнокольорову пігментацію субстратного міцелію, формування та пігментацію повітряного міцелію, а також здатність виділених штамів синтезувати меланоїдні

пігменти, які визначали на пептон-дріжджовому середовищі із залізом (ISP-6) і тирозиновому агарі (ISP-7). Наприклад, штами Lim 3.1, Lim 3.2, Lim 3.3 та Lim 3.4 характеризувались як пігментацією повітряного міцелію, так і продукцією водорозчинних пігментів від темно-бежевого до темно-коричневого кольору за культивування на середовищах ISP-1, ISP-2, ISP-3 та ISP-4. Для штамів Lim 9.2, Lim 12.2 та Lim 12.3 відзначено утворення водорозчинних пігментів лише на окремих середовищах. Загалом, 35,0% штамів, виділених із обростань черепашику, синтезують водорозчинні пігменти.

У цей же час синтез меланоїдних пігментів чорного кольору на середовищі ISP-6 реєстрували лише для штамів Lim 3.1, Lim 3.4 та Lim 12.2, що становить 15,0% від усіх штамів, ізо-



льованих із черепашнику. Здатність до утворення меланоїдних пігментів у мікроорганізмів часто розцінюється як захисна реакція на антропогенне забруднення, спричинене різними поллютантами (Dastager et al. 2006; Panchanathan et al. 2013). Варто зазначити, що більшість штамів не росли на середовищі ISP6 – Lim 2.1, Lim 2.2, Lim 3.2, Lim 4, Lim 7.1, Lim 7.2, Lim 9.1, Lim 9.2. 12.1 та Lim 12.3. На противагу цьому, всі штами росли на середовищі ISP7, але не продукували меланоїдні пігменти.

Для штамів, ізольованих з обростань з бетону, характерна більш темна пігментація субстратного міцелію на середовищах ISP. Здатність до формування водорозчинних пігментів відзначена для штамів Conc 27.1, Conc 36, Conc 41, Conc 42 та Conc 43, що становить 26,3% від усіх штамів. Усі штами із обростань бетону не росли на середовищі ISP6 і росли на ISP7, але меланоїдні пігменти не синтезували (табл. 3).

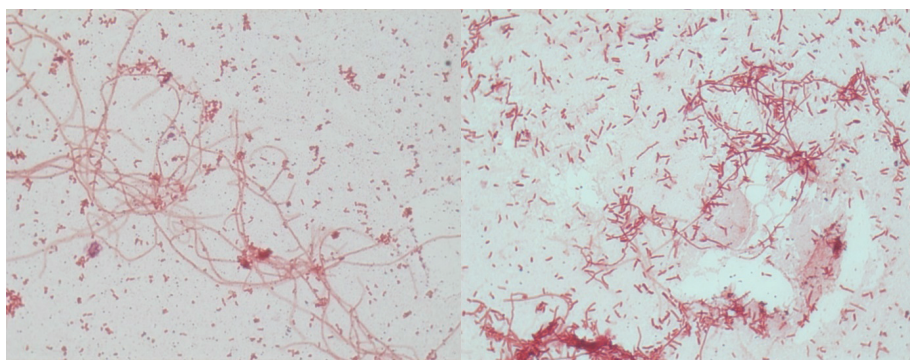
Морфологію клітин виділених актинобактерій визначали, проводячи мікроскопію фіксованих препаратів, забарвлених фуксином (рис. 2).

Таблиця 3

**Характеристика росту штамів актиноміцетів, ізольованих із обростань з бетону на середовищах ISP**

Штам	ISP-1	ISP-2	ISP-3	ISP-4	ISP-5	ISP-6	ISP-7	ISP-9
Conc 19	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 20	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 21	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 22	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 24	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 26	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 27.1	+*	+*	+*	+*	+	-	+	+
Conc 27.2	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 28.2	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 29	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 30	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 32	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 36	+*	+*	+*	+*	+	-	+	+
Conc 37	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 38	+	+	+	+	+	-	+	+
Conc 41	+*	+*	+*	+*	+	-	+	+
Conc 42	+*	+*	+*	+*	+	-	+	+
Conc 43	+*	+*	+*	+*	+	-	+	+
Conc 44	+	+	+	+	+	-	+	+

Примітка: «+» – наявність щільного росту; «-» – відсутність росту; \* – здатність утворювати водорозчинний пігмент.



Lim 3.3

Lim 7.2

**Рис. 2. Морфологія клітин актинобактерій штамів Lim 3.3, Lim 7.2 (світловий мікроскоп, x1500)**

Як правило, клітини більшості актинобактерій представлені короткими паличками невеликих розмірів, розташованих поодиночці, парами у ланцюжках,

V-подібно, хаотично. Окрім того, поряд з короткими паличками в препаратах траплялись ниткоподібні клітини. Клітини деяких досліджених штамів були

у вигляді кокоподібних форм. У препаратах одночасно могли спостерігати різні форми клітин: від кокоподібних до нитчастих.

Оптимальний температурний діапазон росту всіх виділених штамів актинобактерій був у межах від 28 до 37°C.

З урахуванням того, що досліджувані актинобактерії ізольовані з морського середовища, дореч-

ним було дослідити їх відношення до різних концентрацій хлориду натрію. Здебільшого стійкість до NaCl притаманна актинобактеріям, які мешкають у морських екосистемах, і може розглядатись як непрямий доказ їх автохтонного морського походження (Yan Cai et al. 2009). Результати, отримані у разі визначення відношення виділених актинобактерій до хлориду натрію, наведено на рис. 3, 4.

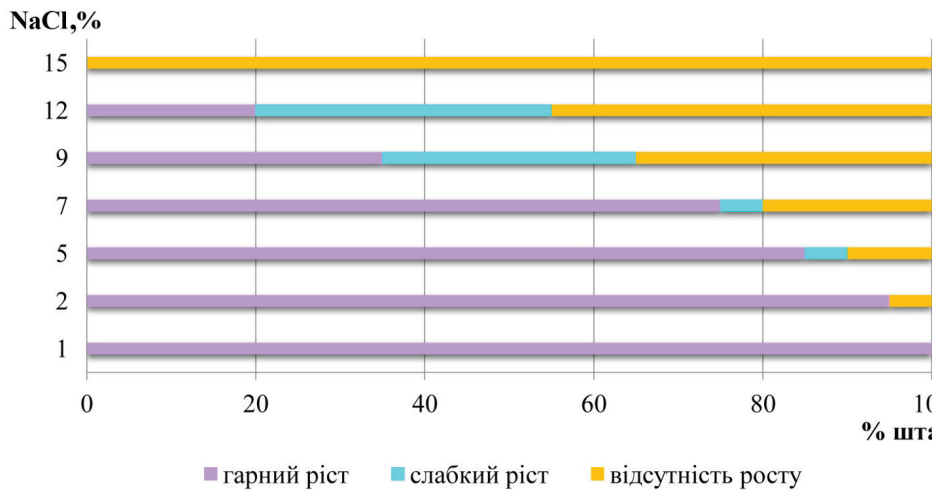


Рис. 3. Частка штамів актинобактерій, ізольованих із обростань черепашнику, толерантних до різних концентрацій NaCl

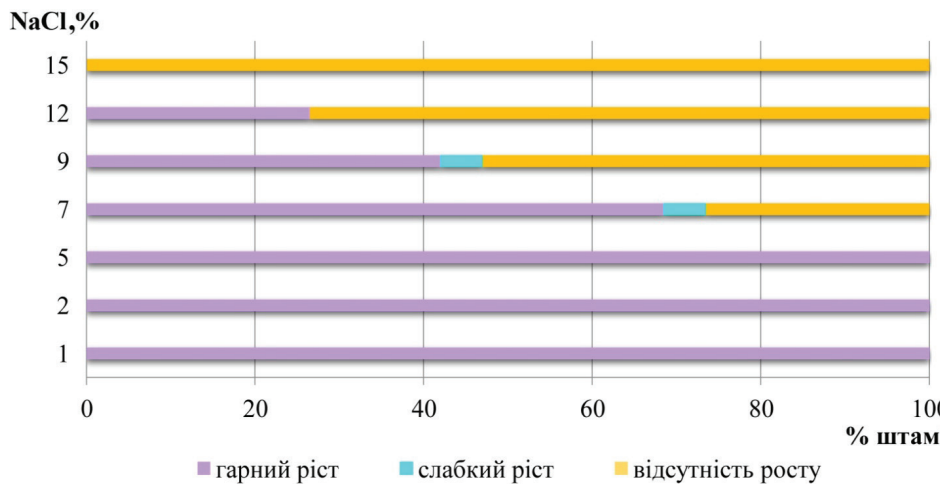


Рис. 4. Частка штамів актинобактерій, ізольованих із обростань бетону, толерантних до різних концентрацій NaCl

Ізольовані актинобактерії росли за граничної концентрації NaCl 12,0%. У разі такої концентрації фіксували ріст 20,0% штамів, ізольованих із черепашнику, і 26,5% штамів, ізольованих з бетонних споруд. Цілком імовірно, що ці штами є автохтон-

ними, і морське середовище є для них природним середовищем існування, хоча можливим є і те, що такі актинобактерії в морі можуть бути і алохтонними, тобто привнесеними із суходолу, і перебувають там, зберігаючи свою життєздатність у вигляді

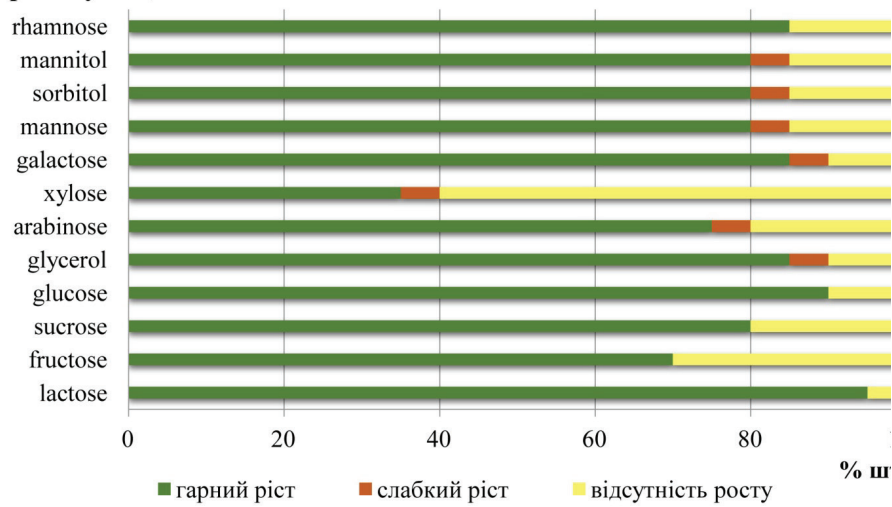
спор. Наші міркування і припущення підтверджуються й іншими дослідниками. Так, наприклад, у роботі Antony-Babu et al. (2008) ідеться про те, що види *Streptomyces* мають космополітичне розповсюдження, оскільки вони утворюють безліч спор, які легко диспергуються, а в публікації Anderson and Wellington (2001) обговорюється, що ці нитчасті бактерії добре адаптовані до морського середовища.

У разі додавання 5,0% NaCl гарний ріст демонстрували 85,0% штамів, ізолюваних з обростань

черепашнику, і 100,0% штамів, ізолюваних з бетону; у разі додавання 7,0% NaCl відповідно 75,0% і 68,5%; у разі додавання 9,0% NaCl гарний ріст відзначено для 35,0% штамів із черепашнику і 42,0% штамів із бетону. Найменш стійкими до NaCl виявились штами Lim 9.1 та Lim 9.2.

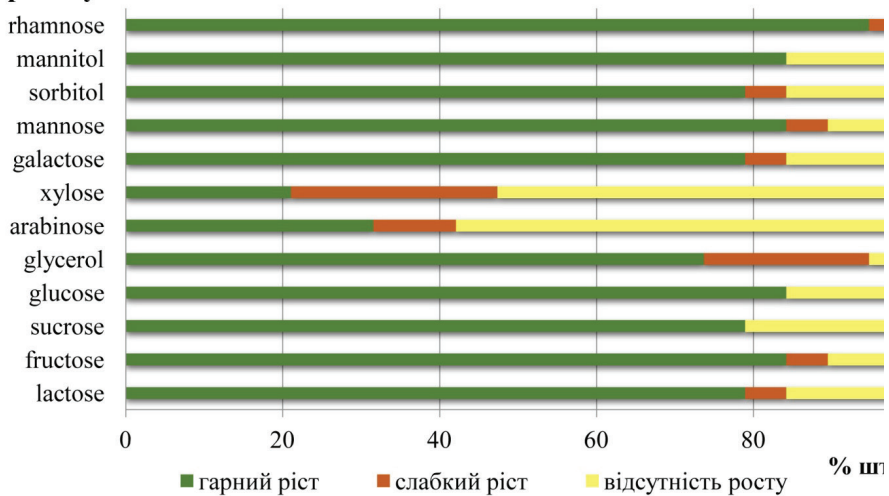
Встановлено, що виділені штами актинобактерій здатні залучати у свій метаболізм різні джерела вуглецю. Усі використані вуглецеві субстрати споживалися бактеріями штамів із черепашнику і штамів із бетонних споруд (рис. 5, 6).

**Джерело вуглецю**



**Рис. 5.** Частка штамів актинобактерій, ізолюваних із обростань черепашнику, здатних до ферментації джерел вуглецю

**Джерело вуглецю**



**Рис. 6.** Частка штамів актинобактерій, ізолюваних із обростань бетону, здатних до ферментації джерел вуглецю

За результатами проведених досліджень максимальна кількість штамів (85,0–95,0%), ізольованих із обростань черепашнику, росте у присутності лактози, глюкози, гліцеролу, галактози та рамнози. Здатність рости у присутності ксилози продемонстрували лише 35,0% штамів.

Виходячи з отриманих даних, найкращим вуглецевим субстратом для виділених актинобактерій була лактоза. За спроможністю бути метаболізованими актинобактеріями із черепашнику джерела вуглецю можна розташувати у такому порядку (від найспоживанішого до найменш придатного): лактоза > глюкоза > гліцерол/галактоза/рамноза > цукроза/манноза/манітол/сорбітом > арабіноза > фруктоза > ксилоза.

Для штамів, ізольованих з обростань бетону, максимально сприятливим вуглеводом для росту виявилась рамноза – 94,7%. Більше 80,0% штамів демонстрували гарний ріст у разі додавання у середовище фруктози, глюкози, маннози та манітолу. Мінімальна кількість штамів (31,6% та 21,6% відповідно) росли у присутності арабінози та ксилози.

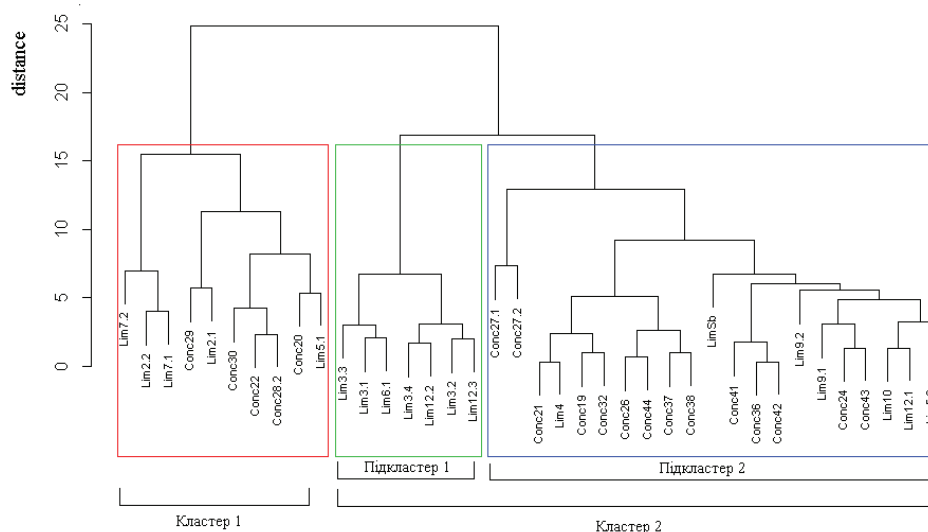
За ступенем утилізації актинобактеріями, ізольованими з обростань бетону, використані вуглецеві субстрати можна розташувати у такому порядку: рамноза > глюкоза/фруктоза/манноза/мані-

тол > цукроза/сорбітол/галактоза > гліцерол > арабіноза > ксилоза.

Іншими дослідниками також показано, що найменш придатним середовищем для росту актинобактерій є середовище з ксилозою (Сищикова 2014).

Використання різних джерел вуглецю штамами актинобактерій, виділеними із поверхонь обростань Чорного моря, свідчить про широкі метаболічні можливості.

Результати кластеризації, проведеної на підставі сукупних культуральних, фізіологічних та біохімічних характеристик досліджених штамів, наведено на рисунку 7. У такому разі спостерігаємо формування двох окремих кластерів, причому великий кластер 2 розпадається на два підкластери. Співвідношення штамів актиноміцетів, ізольованих з різних поверхонь обростання в кластері 1 та кластері 2 рівномірно. Однак слід зазначити, що до підкластера 1 кластера 2 входять тільки штами актинобактерій, ізольовані з поверхонь обростання черепашнику. Однак, незважаючи на деякі відмінності, більшість виділених із різних джерел штамів актинобактерій за результатами кластеризації узагальнених даних можна віднести до однієї сукупності на основі подібності культуральних, фізіологічних та біохімічних характеристик (рис. 7).



**Рис. 7. Дендрограма результатів кластеризації за сукупними культуральними, біохімічними та фізіологічними характеристиками актинобактерій**

Примітка: кластеризація даних здійснювалася за допомогою функції *rect.hclust*, яка дозволяє виділити статистично значущі кластери (для розрахунку матриці відстані використовували метод “canberra”, метод кластеризації “complete”).

Відомо, що ідентифікація актинобактерій не до кінця відпрацьована. Це пояснюється, з одного боку, ототожненням видів із так званими «типovими» штамами стрептоміцетів, з іншого – описом нових видів без урахування внутрішньовидової мінливості. Дослі-

дження показали (Валагурова, Козырицкая и Иутинская 2003), що завдяки мінливості у межах виду трапляються численні різновиди, які є, по суті, варіантами, природними або штучними мутантами з властивостями, відмінними від материнського штаму.



Одним із підходів до попередньої ідентифікації актинобактерій, принаймні до роду, є порівняння їх жирнокислотних спектрів (Kroppenstedt 1985). За отриманими результатами нами встановлено, що виділені із Одеської затоки актинобактерії належать до двох родів *Streptomyces*

і *Nocardioopsis*. Майже всі виділені штами як із черепашнику, так із бетону є представниками роду *Streptomyces* (табл. 4), що характеризувалися досить високою морфологічною варіабельністю, утворюючи різні морфотипи колоній у разі росту на поживних середовищах.

Таблиця 4

Таксономічний склад виділених актинобактерій

Рід	Штами з обростань черепашнику		Штами з обростань бетону	
	Кількість штамів, абс.	% від загальної кількості	Кількість штамів, абс.	% від загальної кількості
<i>Streptomyces</i>	19	95,0	18	95,0
<i>Nocardioopsis</i>	1	5,0	1	5,0

Результати попередньої ідентифікації виділених штамів актинобактерій за жирнокислотними спектрами узгоджуються із даними кластеризації за вивченими властивостями, наведеними на рисунку 7, і свідчать про приналежність виділених штамів до однієї сукупності.

Остаточна ідентифікація виділених штамів буде проведена з урахуванням молекулярно-генетичних характеристик за результатами секвенування 16S рРНК.

#### Висновки

1. Із біологічних обростань черепашнику і бетону, зібраних у червні–липні 2020 р. у районі Гідробіологічної станції ОНУ імені І.І. Мечни-

кова, виділено 20 і 19 штамів актинобактерій відповідно.

2. Ізольовані штами актинобактерій характеризувалися морфологічним плеоморфізмом у разі росту на поживних середовищах. Деякі штами синтезували водорозчинні і меланоїдні пігменти.

3. Більшість виділених штамів проявили толерантність до хлориду натрію.

4. Дослідженим актинобактеріям притаманна значна метаболічна активність, пов'язана із дисиміляцією широкого спектра джерел вуглецю.

5. Більшість ізольованих штамів актинобактерій за результатами попередньої ідентифікації віднесені до роду *Streptomyces*.

#### Список використаних джерел

1. Білявська Л.О. Актинобактерії роду *Streptomyces* і їхні метаболіти у біорегуляції рослин : дис. ... док. біол. наук : 03.00.07. Київ, 2018. 485 с.

2. Валагурова Е.В., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. Актиномицеты рода *Streptomyces*, описание видов и компьютерная программа их идентификации. Киев : Наукова думка, 2003. 618 с.

3. Сищикова О.В. Біологічні властивості та таксономічний склад стрептоміцетів природних ґрунтів техноземів Криворіжжя. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2014. № 1. С. 91–104.

4. Alice Maria B.F., Aruna Sharmili S., Anbumalarnathi J. Isolation and characterization of actinomycetes from marine soil. *MOJ Biol Med*. 2018. Vol.31.6.P.221–225.DOI:10.15406/mojbm.2018.03.00103.

5. Anderson A.S., Wellington E.M.H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Journal Systematic and Evolution Microbiology*. 2001. Vol. 51 (3). P. 797–814. URL: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-797>.

6. Antony-Babu S., Stach J.E., Goodfellow M. Genetic and phenotypic evidence for *Streptomyces*

*griseus* ecovars isolated from a beach and dune sand system. *AntonieVan Leeuwenhoek*. 2008. Vol. 94 (1). P. 63–74.

7. Dastager S.G., Li W.J., Dayanand A. et al. Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *African Journal of Biotechnology*. 2006. Vol. 5 (8). P. 1131–1134.

8. Dhakal D., Pokhrel A.R., Shrestha B., Sohng J.K. Marine Rare Actinobacteria: Isolation, Characterization, and Strategies for Harnessing Bioactive Compounds. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8(1106). P. 1–13. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01106.

9. Ettoumia B., Chouchanec H., Guesmia A. et al. Diversity, ecological distribution and biotechnological potential of Actinobacteria inhabiting seamounts and non-seamounts in the Tyrrhenian Sea. *Microbiological Research*. 2016. No. 186–187. P. 71–80. DOI: 10.1016/j.micres.2016.03.006.

10. Jayashanth E. Actinobacteria – morphology, physiology, biochemistry, diversity and Industrial Applications of genus *Actinobacteria* : Microbiology Assignment, 2015. P. 1–16. DOI: 10.13140/RG.2.1.2632.5928.

11. Kroppenstedt R.M. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. *Chemical Methods in Bacterial Systematics* / M. Goodfellow, D.E. Minnikin. Academic Press, London, 1985. P. 173–199.
12. Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K., Kim S.K. Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiological Research*. 2013. Vol. 168 (6). P. 311–332. DOI: 10.1016/j.micres.2013.02.002.
13. Maria A.B.F., Sharmili A.S., Anbumalaramathi J. Isolation and characterization of actinomycetes from marine soil. *MOJ Biol Med*. 2018. Vol. 3 (6). P. 221–225. DOI: 10.15406/mojbm.2018.03.00103.
14. MIS Operation Manual. www.midi-inc.com. September. 2012. Newark.
15. Panchanathan M., Jayachandran V., Se-Kwon Kim. Introduction to Marine Actinobacteria. *Marine microbiology* / Se-Kwon Kim. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. P. 1–19. URL: <https://doi.org/10.1002/9783527665259.ch01>.
16. Qinyuan Li, Xiu Chen, Yi Jiang, Chenglin Jiang. Cultural, Physiological, and Biochemical Identification of Actinobacteria, Actinobacteria – Basics and Biotechnological Applications, Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang, IntechOpen, 2016. URL: <http://dx.doi.org/10.5772/61462>.
17. Sasser M. Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters (GC-FAME). Technical Note 101. Newark, DE: MIDI. 2006.
18. Sathiyaseelan K., Saranraj P. Antagonistic activity of marine actinobacteria – a review. *Indo-Asian Journal of Multidisciplinary Research*. 2016. Vol. 2. I. 4. P. 698–717.
19. Shirling E.B., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1966. Vol. 16. P. 313–40.
20. Subramani R., Aalbersberg W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.* 2012. Vol. 167. P. 571–580.
21. Subramani R., Sipkema D. Marine Rare Actinomycetes: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products. *Marine Drugs* 2019. Vol. 17 (249). P. 1–35. DOI: 10.3390/md1705024.
22. Ward A.C, Bora N. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2006. Vol. 9. P.279–286.
23. Yan Cai, Q. Xue, Zhan-quan Chen, Rong Zhang. Classification and Salt-tolerance of Actinomycetes in the Qinghai Lake Water and Lakeside Saline Soil. *Journal of Sustainable Development*. 2009. Vol. 2 No 1. P. 107–110. DOI: 10.5539/JSD.V2N1P107.
24. Yanti A.H., Setyawati T.R., Kurniatuhadi R. Composition and Characterization of Actinomycetes Isolated from Nipah Mangrove Sediment, Gastrointestinal and Fecal Pellets of Nipah Worm (Namalycastis Rhodhocorde). *International Conference of Mangroves and Its Related Ecosystems: OP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 2019. P. 1–11. DOI: 10.1088/1755-1315/550/1/012003.

## References

1. Bilyavs'ka, L.O. (2018). Aktynobakteriyi rodu *Streptomyces* i yikhni metabolity u bioregulyaciyi roslyn [*Actinobacteria of the genus Streptomyces and their metabolites in plant bioregulation*]: dis. ... doc. biol. nauk. Kyiv. 485 p. [in Ukrainian].
2. Valagurova, E.V., Kozyritckaya, V.E., Iutinskaya, G.A. (2003). Aktinomitsety roda *Streptomyces*, opisanie vidov I komp'uternaia programma ikh identifikatsii [*Actinomycetes of the genus Streptomyces, description of species and computer program for their identification*]. Kiev: Naukova dumka. 618 p. [in Russian].
3. Syschchykova, O.V. (2014). Biologichni vlastyvyosti ta taksonomichniy sklad streptomycetiv pryrodnykh gruntiv tekhnoszemiv Kryvorizhzhya [Biological properties and taxonomic composition of streptomycetes of natural soils of Kryvyi Rih techno-soils]. *Mikrobiologiya i Biotechnologiya*, 1, 91–104 [in Ukrainian].
4. Alice Maria, B.F., Aruna, Sharmili S., Anbumalaramathi, J. (2018). Isolation and characterization of actinomycetes from marine soil. *MOJ Biol Med*, 3, 6, 221–225. DOI: 10.15406/mojbm.2018.03.00103.
5. Anderson, A.S., Wellington, E.M.H. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 3, 797–814. Retrieved from: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-797>.
6. Antony-Babu, S., Stach, J.E., Goodfellow, M. (2008). Genetic and phenotypic evidence for *Streptomyces griseus* ecovars isolated from a beach and dune sand system. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94 (1), 63–74.
7. Dastager, S.G., Li, W.J., Dayanand, A. et al. (2006). Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *African Journal of Biotechnology*, 5 (8), 1131–1134.
8. Dhakal, D., Pokhrel, A.R., Shrestha, B., Sohng J.K. (2017). Marine Rare Actinobacteria: Isolation, Characterization, and Strategies for Harnessing Bioactive Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 8 (1106), 1–13. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01106.
9. Ettoumia, B., Chouchanec, H., Guesmia, A. et al. (2016). Diversity, ecological distribution and biotechnological potential of Actinobacteria inhabiting seamounts and non-seamounts in the Tyrrhenian Sea. *Microbiological Research*, 186–187, 71–80. DOI: 10.1016/j.micres.2016.03.006.
10. Jayashanth, E. (2015). Actinobacteria – morphology, physiology, biochemistry, diversity and Industrial Applications of genus *Actinobacteria*

- : Microbiology Assignment, 1–16. DOI: 10.13140/RG.2.1.2632.5928.
11. Kroppenstedt, R.M. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. *Chemical Methods in Bacterial Systematics* / M. Goodfellow, D.E. Minnikin. Academic Press, London, 173–199.
  12. Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S.K. (2013). Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiological Research*, 168 (6), 311–332. DOI: 10.1016/j.micres.2013.02.002.
  13. Maria, A.B.F., Sharmili, A.S., Anbumalar-mathi, J. (2018). Isolation and characterization of actinomycetes from marine soil. *MOJ Biol Med.* 3 (6), 221–225. DOI: 10.15406/mojbm.2018.03.00103.
  14. MIS Operation Manual. www.midi-inc.com. September. 2012. Newark.
  15. Panchanathan, M., Jayachandran, V., Se-Kwon, Kim. (2013). Introduction to Marine Actinobacteria. *Marine microbiology* / Se-Kwon Kim. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1–19. Retrieved from: <https://doi.org/10.1002/9783527665259.ch01>.
  16. Qinyuan, Li, Xiu, Chen, Yi, Jiang, Chenglin, Jiang. (2016). Cultural, Physiological, and Biochemical Identification of Actinobacteria, Actinobacteria – Basics and Biotechnological Applications, Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang, IntechOpen. Retrieved from: <http://dx.doi.org/10.5772/61462>.
  17. Sasser, M. (2006). Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters (GC-FAME). Technical Note 101. Newark, DE: MIDI.
  18. Sathiyaseelan, K., Saranraj, P. (2016). Antagonistic activity of marine actinobacteria – a review. *Indo-Asian Journal of Multidisciplinary Research*, 2, 4, 698–717.
  19. Shirling, E.B., Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16, 313–40.
  20. Subramani, R., Aalbersberg, W. (2012) Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.*, 167, 571–580.
  21. Subramani, R., Sipkema, D. (2019). Marine Rare Actinomycetes: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products. *Marine Drugs*, 17, 249, 1–35. DOI: 10.3390/md1705024.
  22. Ward, A.C, Bora, N. (2006). Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr Opin Microbiol.*, 9, 279–286.
  23. Yan, Cai, Q., Xue, Zhan-quan, Chen, Rong, Zhang. (2009). Classification and Salt-tolerance of Actinomycetes in the Qinghai Lake Water and Lakeside Saline Soil. *Journal of Sustainable Development*, 2, 1, 107–110. DOI: 10.5539/JSD.V2N1P107.
  24. Yanti, A.H., Setyawati, T.R., Kurniatuhadi, R. (2019). Composition and Characterization of Actinomycetes Isolated from Nipah Mangrove Sediment, Gastrointestinal and Fecal Pellets of Nipah Worm (Namalycastis Rhodhocorde): International Conference of Mangroves and Its Related Ecosystems: OP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 1–11. DOI: 10.1088/1755-1315/550/1/012003.

## ACTINOBACTERIA OF GROWTH OF SOLID SUBSTRATES OF THE ODESA GULF OF THE BLACK SEA

**Strashnova I.V.**, PhD, Senior Researcher  
Odesa I.I. Mechnikov National University  
fabiyanska@ukr.net

**Korotaeva N.V.**, PhD, Researcher  
Odesa I.I. Mechnikov National University

**Potapenko K.S.**, Postgraduate Student  
Odesa I.I. Mechnikov National University

**Vasylieva N.Yu.**, PhD, Senior Researcher  
Odesa I.I. Mechnikov National University

**Chaban M.M.**, Engineer  
Odesa I.I. Mechnikov National University

**Shtenikov M.D.**, PhD, Researcher  
Odesa I.I. Mechnikov National University

**Lisyutin G.V.**, Researcher  
Odesa I.I. Mechnikov National University

**Ivanytsia V.O.**, Corresponding Member of NAS of Ukraine, DSc (Biology), Professor  
Odesa I.I. Mechnikov National University

Studies of the activity and interaction of marine microorganisms with other organisms provide an understanding of the functioning of biogeochemical processes, food chains and symbiosis. Marine microbiome members also have useful properties that can be used to search for and produce new products and develop new processes in marine biotechnology. Representatives of actinobacteria isolated from various sources of the marine environment are especially promising in this aspect. The aim of the study was to isolate actinobacteria from biological overgrowth of concrete structures and natural shellfish of the Odesa Bay, to determine their main biological properties and biological diversity. As a result, 20 and 19 strains of actinobacteria were isolated from the overgrowth of shell rock and concrete surfaces, respectively. The isolated bacteria were characterized by morphological variability during growth on nutrient media (MPA, OA, SCA, ISP-1 – ISP-6), forming substrate and aerial mycelium. Some strains synthesized water-soluble and melanoid pigments on appropriate media. Most strains grew well in the presence of NaCl at a concentration of less than 9%, and the strains isolated from concrete fouling are more resistant to this chemical agent. Isolated strains utilized various carbon substrates, demonstrating significant metabolic activity and capacity. The most commonly used substrate for all isolated strains was lactose, the least suitable – xylose (only 35,0% of strains isolated from shell rock, and 21,6% of strains from concrete overgrowth metabolized this carbohydrate). Preliminary identification of isolated strains of actinobacteria by determining the spectra of fatty acids defined that almost all of them are members of the genus *Streptomyces*. At the first actinobacteria were isolated from the Odesa Bay of the Black Sea, morphological, cultural and physiological-biochemical properties of the obtained strains were characterized. Their taxonomic composition and prospects of use for the search for producers of biologically active substances have been preliminarily determined.

**Key words:** Black Sea, Odesa Bay, biological fouling, actinobacteria, biological properties.