

ВПЛИВ N-МЕТИЛ-N'-НІТРО-N-НІТРОЗОГУАНІДИНУ НА АВЕРМЕКТИНСИНТЕЗУЮЧУ ЗДАТНІСТЬ *STREPTOMYCES AVERMITILIS* УКМ АС-2179 ТА ПОЯВУ АУКСОТРОФНИХ МУТАНТІВ

Н.М. СЕРГІЙЧУК,

*аспірант кафедри екобіотехнології та біорізнноманіття
Національний університет біоресурсів і природокористування України,
<https://orcid.org/0000-0001-6690-0114>*

Л.О. БІЛЯВСЬКА,

*завідувач відділу загальної та ґрунтової мікробіології
Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН
України,*

<https://orcid.org/0000-0002-8785-4361>

Ю.В. КОЛОМІЄЦЬ,

*професор кафедри екобіотехнології та біорізнноманіття
Національний університет біоресурсів і природокористування України*

E-mail: julyja12345@gmail.com,

<http://orcid.org/0000-0002-1919-6336>

Л.В. ЗІНЧЕНКО,

*провідний інженер відділу загальної та ґрунтової мікробіології
Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного
НАН України*

<http://orsid.org/009-006-9200-3111>

Н.А. ІЛЮК,

*доцент кафедри мікробіології, сучасних біотехнологій, екології та імунології
Відкритий міжнародний університет розвитку людини «Україна»*

<https://orcid.org/0000-0002-3296-4790>

Анотація. Важливим шляхом переходу до екологічно безпечних агротехнологій є відмова від хімічних засобів захисту рослин і перехід на біологічні. Ефективність використання хімічних засобів захисту рослин поступово знижується, що пов'язано з появою резистентних популяцій шкідників та збудників хвороб. Метою представленої роботи було дослідження впливу N-метил-N-нітро-N-нітро-

зогуанідину на виживання та виділення високоактивних варіантів *S. avermitilis* УКМ Ас-2179, авермектинсинтезуюча активність яких була б вищою за таку вихідного штаму.

У роботі використано біохімічні методи визначення авермектинсинтезуючої активності, якісну оцінку здатності культури до синтезу авермектинів проводили методом ТШХ, концентрацію авермектинів в етанольних екстрактах визначали колориметричним методом. Досліджено вплив *N*-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідину на життєздатність та антибіотичну активність продуцента авермектинового комплексу *S. avermitilis* УКМ Ас-2179. Встановлено, що оптимальними для отримання клонів з підвищеною антибіотичною активністю є тривалість обробки 15 хв *N*-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідину, при яких виживає 30% спор досліджуваного штаму, а біосинтетична активність зростала у 2,7 рази. Для виявлення клонів *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 з підвищеним синтезом природних авермектинів можна використовувати метод індукованого МННГ-мутагенезу.

Ключові слова: *Streptomyces avermitilis*, авермектини, *N*-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідин, мутант

Вступ.

На сьогодні все більше уваги приділяється вивченню екологічної ролі та біосинтетичної активності ґрунтових мікроорганізмів (Saccá et al., 2017; De Jesus Sousa et al., 2017; Dholakiya et al., 2017; Golinska et al., 2015). Стрептоміцети – група ґрунтових мікроорганізмів, які синтезують ряд біологічно-активних речовин, відіграють провідну роль у перетворенні органічних сполук і формуванні ефективної родючості ґрунту (Harir et al., 2018; Alam et al., 2022; Klementz et al., 2016; Valli et al., 2012). Створені на основі стрептоміцетів препарати є перспективною складовою інтегрованої системи захисту сільськогосподарських культур, а в деяких випадках – альтернативною хімічним засобам (Bilyavska, 2018; Alam et al., 2022; Jones, 2023; Cheng et al., 2016; Hamed et al., 2015; Iutynska et al., 2011; Pastor et al., 2013).

Останнім часом все більшого поширення набувають препарати на

основі макролідного антибіотика авермектину, що продукується ґрунтовим стрептоміцетом *Streptomyces avermitilis* (Bilyavska, 2018; El-Saber Batiha et al., 2020; Wang et al., 2023; Iutynska et al., 2017) препарат проявляє інсектицидну, акарицидну, нематоцидну та фунгіцидну дію, тому має широке використання.

Важливим завданням виробництва мікробних препаратів є підвищення біосинтетичної активності штамів-продуцентів. Для вирішення цього завдання можна застосовувати індукований мутагенез з використанням хімічних та фізичних мутагенів, таких як органічні кислоти, амінокислоти і ін. Зокрема

N-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідину (нітрогуанідин, МННГ) – мутагенний агент, який сприяє появі мутації переважно в точці реплікації ДНК, що може призводити до появи варіантів з підвищеною біосинтетичною активністю (Jones, 2023; Petruk et al., 2004; Dashwood, 2021; Martín, 2020; Vinogradov et al., 2020).

Співробітниками відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України у 1999 році було виділено з ґрунту два штами *S. avermitilis*. В результаті селекції шляхом спонтанної мінливості та індукованого мутагенезу отримано штам *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 із здатністю утворювати від 900 до 1600 мкг авермектину в 1 мл етанольного екстракту (Petruck et al., 2004; Iutynska et al., 2017). Авермектинвмісний комплекс, який синтезує цей штам отримав назву аверком. З часом, активність штамів продуцентів поступово втрачається, а тому залишається актуальним питання вивчення шляхів підтримання та підвищення продуктивності штаму *S. avermitilis* і створення на його основі поліфункціональних мікробних препаратів, які знаходять застосування у різних галузях медицини, сільського господарства та промисловості.

Метою роботи було дослідження впливу N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину на виживання та виділення високоактивних варіантів

S. avermitilis УКМ Ас-2179, авермектинсинтезуюча активність яких була б вищою за таку вихідного штаму.

Матеріали та методи дослідження.

В роботі був використаний штам *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 селекціонований у відділі загальної і ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного з використанням N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (МННГ) за впливу на природний штам *Streptomyces avermitilis* виді-

лений з чорноземного ґрунту Попельнянського району Житомирської області (Iutynska et al., 2017).

Культивування стрептоміцетів здійснювали на агаризованих органічному та мінеральному середовищах (поверхневим способом). Склад картопляно-глюкозного агару (КГА) повноцінний: очищена картопля 200 г/л; CaCO_3 3 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 г/л; агар-агар 15 г/л; глюкоза 20 г/л (рН 6,8-7,2). Стерилізацію середовища здійснювали при 0,5 атм впродовж 20 хв. Синтетичне середовище Цімбуркової (ССЦ): агар-агар 15 г/л; NaCl 2 г/л; K_2HPO_4 0,5 г/л; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,8 г/л; CaCO_3 5 г/л; глюкоза 70 г/л; мікроелементи: FeSO_4 5 г/л; MgSO_4 10 г/л; MnSO_4 5 г/л; ZnSO_4 5 г/л (рН 7,4) (Petruck et al., 2004). Стерилізацію середовища здійснювали при 0,75 атм протягом 2 год (Chen et al., 2016). Використовували чашки Петрі чи пробірки (по 15-20 мл середовища у кожную) або скляні плоскі флакони (матраци) об'ємом 1,5 л (по 150 мл середовища). Культивування проводили за температури +28°C впродовж 1-10 діб в залежності від мети досліджу.

Матеріалом слугувала суспензія спор *S. avermitilis* УКМ Ас-2179, яку готували шляхом змивання спор з поверхні агаризованого органічного середовища водним розчином 20%-го гліцерину. В матрац, що містить 2-тижневу культуру стрептоміцету на скошеному агарі, вносили 50 мл гліцерину і за допомогою стерильної бактеріальної петлі знімали повітряний міцелій (ПМ). Одержану суспензію спор і фрагментів фільтрували через стерильний ватно-марлевий фільтр, щоб звільнити її від агрегатів та залишків середовища. Одержана таким чином суспензія зберігалась за

температури +4°C і була використана для відповідних маніпуляцій в роботі. Контроль за стерильністю спорової суспензії та визначення її титру здійснювали шляхом висіву відповідних розведень на живильне середовище (Petruk et al., 2004; Alef, 1995).

Моноспорову суспензію вносили в стерильні, хімічно чисті пробірки. Вихідний розчин МННГ (6 мг/мл) готували безпосередньо перед дослідом, розчиняючи НГ в цитратному 0,1 М буфері (рН 5,5). Склад цитратного буферу: 0,1 г цитрат натрію; 10,5 г лимонної кислоти; 4,4 г NaOH. В якості контролю використовували 1 мл цитратного буферу, до якого додавали 0,5 мл вихідної суспензії, в експерименті додавали по 0,5 мл цитратного буферу, 0,5 мл суспензії та 0,5 мл розчину МННГ. Обробку МННГ проводили протягом 15, 30, 45, 60 хв (Petruk et al., 2004; Fedorenko et al., 2007). Оброблені спори осаджували з реакційної суміші шляхом центрифугування (4000 об/хв., 30 хв). Отриманий осад спор ресуспендували в мінімальній кількості 0,6-1 мл цитратного буферу.

Кожну порцію обробленої суспензії після ряду десятикратних розведень висівали на КГА. Після вирощування впродовж 10 діб за температури +28°C проводили оцінку виживання спор культури. На 14-у добу проводили відсів моноізолятів з подальшим визначенням їхньої здатності синтезувати авермектин.

Вміст авермектинів визначали у спиртовому екстракті з міцелію УКМ Ас-2179 (Petruk et al., 2004; Bilyavska, 2018).

За вирощування культури на поверхні КГА впродовж 10 діб, екстракцію проводили, заливаючи 5 мл 96 %-го етанолу у пробірку з куль-

турою, за допомогою бактеріальної петлі знімали спори і міцелій, добре струшували і відстоювали 30 хв. Екстракт фільтрували через паперовий фільтр.

Якісну оцінку здатності культури до синтезу авермектинів проводили методом ТШХ в системі гексан-ацетон-етанол (56:24:4). Хроматографію проводили на сілікогелевих пластинках Sorbfil (виробник ТОВ "Сорб-полімер-Аналітик"). Хроматограми проявляли шляхом їх обробки 0,75%-вим розчином перманганату калію впродовж 5 хв. Контролем слугував стандартний розчин авермектинів "Аверсектин С" для хроматографії. За плямами, що утворились на хроматографічних пластинках, встановлювали наявність авермектинів в досліджуваних екстрактах (Bilyavska, 2018).

Концентрацію авермектинів в етанольних екстрактах визначали колориметричним методом, в основі якого лежить кольорова реакція Біалія – процес зміни інтенсивності поглинання світла за $\lambda = 630\text{-}640$ нм продуктом взаємодії авермектинів з орцином (Petruk et al., 2004). Розчини для визначення: розчин №1 – орцин (10 мкг на 1 пробу) розчиняли в краплі етилового спирту (готують безпосередньо перед вимірюванням); розчин №2 – 90 мл концентрованої HCl та 0,1 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; розчин №3 – на кожні 10 мкг орцину 2 мл розчину №2. До 2-х мл етанольного екстракту додавали 1 мл етилового спирту і 2 мл розчину №3. Суміш ретельно перемішували, нещільно закривали та витримували 15-20 хв на водяній бані за температури +80-81°C, потім охолоджували під струменем холодної води. Інтенсивність поглинання визначали на фотоелектрокалориметрі КВК-3 за $\lambda = 630\text{-}640$ нм.

Здатність до продукування авермектинів оцінювали за кількістю авермектинів (мкг) в 1 мл етанольного екстракту з одиниці біомаси міцелію стрептоміцету. Вміст авермектинів оцінювали за інтенсивністю поглинання, використовуючи калібрувальний графік, побудований за різними концентраціями препарату авермектинів фірми "Merck" (США). Ауксотрофність отриманих мутантів з використанням МННГ визначали згідно методики (Fedorenko et al., 2007).

Розрахунки і статистичну обробку даних виконували за допомогою комп'ютерних програм Statistica 6.0 та Microsoft Office Excel 10.

Результати та їх обговорення

Популяція штаму *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 після обробки його спорової суспензії мутагеном, виявилась досить гетерогенною. За дії МННГ на актиноміцети, спостерігається виражена зміна культурально-морфологічних ознак 10-добових колоній, які вирости на ГКА, і були віднесені до трьох типів:

I тип. Добре споруючі колонії зі складчастою або опуклою поверхнею, край валикоподібний з вузьким білим обідком, в центрі помітна кратероподібна впадина; колонії помітно

виступають над поверхнею середовища. Повітряний міцелій сіро-коричневого кольору з білими вкрапленнями або без них; субстратний міцелій темно-коричневий; розчинний пігмент відсутній. Така властивість може бути пов'язана з підвищеною здатністю до синтезу авермектинів.

II тип. Колонії добре опушені з валикоподібним краєм і кратероподібною впадиною посередині. Повітряний міцелій білий, субстратний міцелій коричневий, розчинний пігмент відсутній.

IV тип. Колонії плоскі або опуклі, інколи з кратероподібною впадиною; Повітряний міцелій відсутній, субстратний міцелій бежевого кольору, розчинний пігмент відсутній.

В популяції *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 кількість колоній I-го типу становила 32,5%, колоній II-го типу було 43,0% і колоній IV типу – 24,5% від загального числа одержаних колоній.

Залежність виживання спор культури стрептоміцету від тривалості дії МННГ та його концентрації представлені в таблиці 1.

Як свідчать отримані дані, навіть короткочасна обробка спор культури *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 МННГ впродовж 15 хв призводила до зниження виживання більше, ніж у 3 рази (рис. 1). Зниження цього показ-

1. Вживання спор *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 в залежності від тривалості їх обробки МННГ

Тривалість обробки спор МННГ, хв	Титр спор в суспензії, КУО	Вживання, %
Контроль (0)	$1,3 \cdot 10^7$	100,0
15	$4,2 \cdot 10^6$	30,0
30	$1,2 \cdot 10^6$	8,8
45	$4,5 \cdot 10^5$	4,2
60	$3,4 \cdot 10^4$	2,6

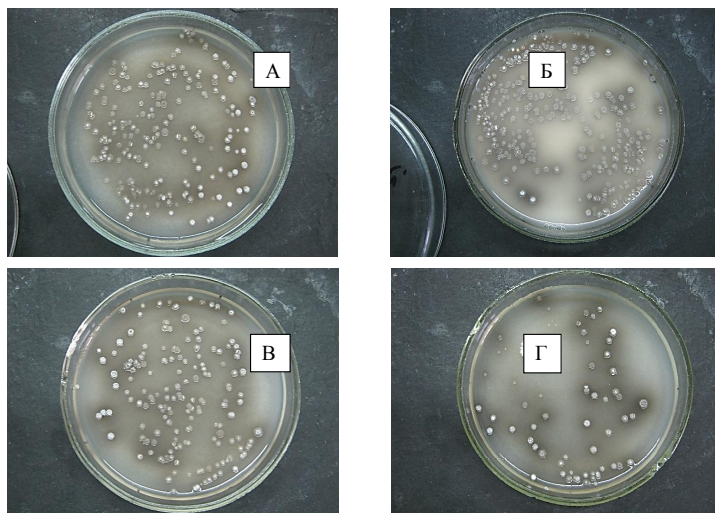


Рис. 1. Зниження виживання спор культури *S. avermitilis* після дії МННГ (за експозиції А-15 хв, Б-30 хв, В-45 хв, Г-60 хв.)

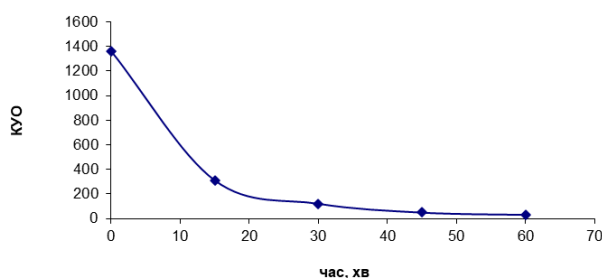


Рис. 2. Виживання спор *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 в залежності від тривалості їх обробки МННГ

ника спостерігалось і при збільшенні тривалості обробки до 60 хв. Більш тривала експозиція МННГ призвела до подальшого зниження виживання (рис. 2).

В результаті МННГ-мутагенезу було отримано мутанти, які і перевіряли на авермектин синтезуючу здатність. Серед них відмічено появу як плюс- (30%), так і мінус (70%) варіантів.

Плюс-варіанти були в основному ті, що змінювали забарвлення сере-

довища. Біосинтетична активність окремих варіантів зростала, зокрема у варіанта №54 вона була у 2,7 рази вищою (на 200%) від такої вихідного штаму УКМ Ас-2179. Біосинтетичні властивості мутантів *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 наведені в таблиці 2.

Таким чином, популяція *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 виявилась досить чутливою до мутагенних факторів. З використанням індукованого мутагенезу вдалося

2. Біосинтетичні властивості мутантів *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179

Варіанти (мутанти)	Авермектин синтезу- вальна здатність, (мкг/мл)	% до контролю
2179 (вихідний)	957 ± 10,3	100
2179(1)	1320 ± 12,1	138
2179(54)	2650 ± 17,2	277
2179(10)	1589 ± 13,3	166
2179(75)	2364 ± 16,2	247

отримати варіанти, авермектин синтезуюча здатність яких перевищувала активність вихідного штаму у 2,7 рази.

Варіант № 54 штаму *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 в цілому зберіг усі типові ознаки природного штаму УКМ Ас-2161. Основні з них наведено нижче.

Мікроморфологічні ознаки: в умовах поверхневого вирощування на агаризованих середовищах (рН 6,8-7,4; температура 28 °С) стрептоміцет утворює спорофори у вигляді невеликих спіралей (до 3-5 завитків), які при суцільному рості з віком розташовуються так тісно, що приймають вигляд клубочків. Оболонка спор гладка.

Макроморфологічні ознаки: за тих же умов росту протягом перших семи діб окремі колонії плоскі на вигляд і, зазвичай, мають невеликі розміри (3-5 мм у діаметрі, а, іноді, і менше); з віком (7-14 діб) колонії збільшуються у діаметрі до 1,0 см. У центрі колоній з'являється підвищення, на якому можна спостерігати більш-менш виразну складчастість. При суцільному рості складчастість або бугорчастість проявляються лише по краях росту.

Культуральні ознаки: на КГА стрептоміцет росте добре, з віком змінюється від бурюватого кольору до

темно-коричневого з червонуватим відтінком. ПМ також добре розвинений, у 7-добовому віці він має білувато-сіре забарвлення з коричнюватим відтінком; у 14-добовому віці білий відтінок зникає, проте до забарвлення додається слабкий жовтуватий відтінок, розчинний пігмент відсутній.

Таким чином, встановлено, що культура *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 є гетерогенною популяцією з досить великою кількістю варіантів, відмінних між собою як за типами колоній, так і за рівнем біосинтетичної активності. Така варіабельність підвищує ймовірність одержання позитивних результатів при проведенні подальших селекційних робіт з метою відбору високопродуктивних варіантів. Шляхом індукованого мутагенезу вдалося підвищити активність вихідного штаму *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 з 957 мкг/мл до 2650 мкг/мл та відібрати варіант для подальшої роботи.

Із літературних джерел відомо (Dashwood, 2021; Rütten et al., 2022), що під впливом того чи іншого мутагенного фактору можна ізолювати варіанти, активність яких перевищує таку вихідну на 20-40 % і більше відсотків. Застосовуючи ступінчасту схему відбору можна підвищити ак-

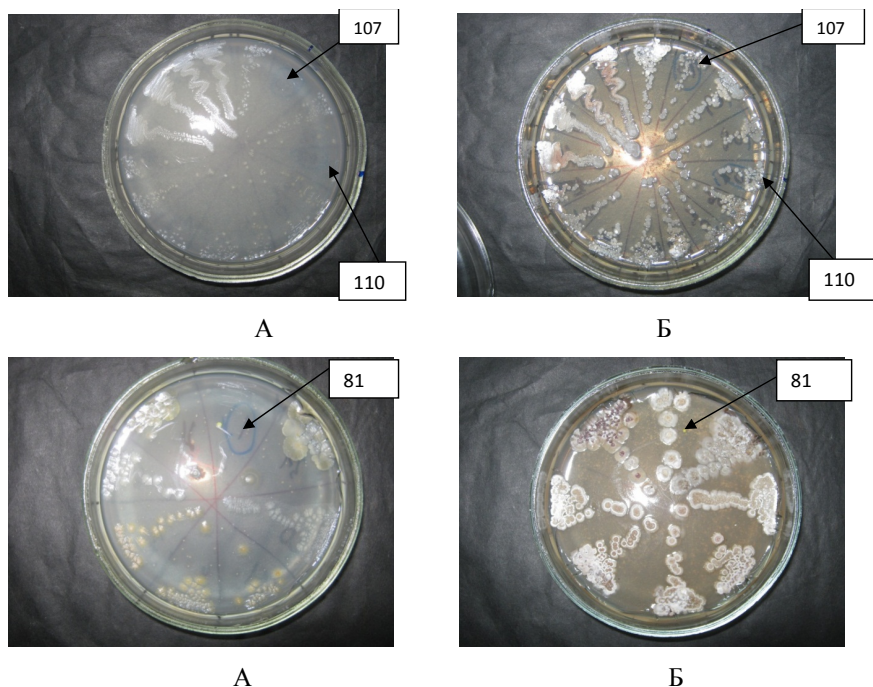


Рис. 3. Перевірка варіантів *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 на ауксотрофність (А – мінімальне середовище, Б – КГА)

тивність певного продуцента в десятки і сотні разів.

З іншої сторони, застосовуючи мутагенний агент нітрозогуанідин, можна отримати досить повний набір ауксотрофних мутантів, які можуть бути використані в генетичних схрещуваннях. Прототрофні рекомбінанти від таких схрещувань часто мають підвищену біосинтетичну активність (Jones, 2023; Dashwood, 2021).

В даній роботі колонії стрептоміцета, які були отримані після МННГ-мутагенезу, перевірялися тотальним методом на ауксотрофність.

В досліді була визначена експозиція, або час дії МННГ, тобто, 15, 30, 45 та 60 хв. Це дозволило, крім того, побудувати криву виживання спор *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179

після дії МННГ. Знаючи виживання після кожної експозиції, можна було відбирати немало кількість колоній на чашці при їхній наступній перевірці. Так, було перевірено близько 1500 колоній *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179. Серед них було відмічено 9 варіантів (№101, 103, 107, 110, 54, 81, 1, 96, 99) які не росли на мінеральному мінімальному середовищі (рис. 3).

Частота появи цих варіантів на первинному етапі відбору становила 0,006 %. Дані варіанти після реізоляції і повторної перевірки на середовищі того ж самого складу, можна було вважати ауксотрофними мутантами і були придатними до ідентифікації їх ростових потреб.

Важливим шляхом переходу до екологічно безпечних агротехнологій

є відмова від хімічних засобів захисту рослин і перехід на біологічні. Як показують результати багаторічних спостережень, ефективність використання хімічних засобів захисту рослин поступово знижується, що пов'язано з появою резистентних популяцій шкідників та збудників хвороб. Літературні дані свідчать про те, що авермектини є досить перспективними сполуками при створенні екологічно безпечних високоефективних препаратів для лікування паразитарних захворювань тварин і людини та засобів боротьби із шкідниками сільськогосподарських культур (Bilyavska, 2018; El-Saber Batiha et al., 2020; Wang et al., 2023; Iutynska et al., 2017).

Зважаючи на це, отримання вітчизняного конкурентоспроможного штаму – продуценту авермектинів та його підтримка на високому біосинтетичному рівні є актуальним та вкрай необхідним завданням.

У відділі загальної та ґрунтової мікробіології ІМВ НАН України був виділений та селекціонований штам *S. avermitilis*, зареєстрований та депонований в Українській Колекції мікроорганізмів ІМВ НАН України під номером УKM Ас-2179 з вихідною активністю 1600 мкг/мл, але з часом вона знизилась до 957 мкг/л, що знижує його конкурентноздатність для впровадження в промислове виробництво, а тому потребує постійної підтримки і селекції (Petruk et al., 2004). Проведена нами робота по підвищенню біосинтетичної активності штаму *Streptomyces avermitilis* УKM Ас-2179 дала змогу збільшити шляхом індукованого мутагенезу активність вихідного штаму *Streptomyces avermitilis* УKM Ас-2179 в 2,7 разів.

Популяція *Streptomyces avermitilis*

УKM Ас-2179 виявилась досить чутливою до мутагенних факторів, зокрема, після обробки його спорової суспензії МННГ спостерігається виражена зміна культурально-морфологічних ознак. Встановлено залежність виживання спор культури стрептомицету від тривалості дії МННГ та його концентрації.

Як свідчать отримані дані, навіть короточасна обробка МННГ спор культури *Streptomyces avermitilis* УKM Ас-2179 впродовж 15 хв призводила до зниження виживання більш ніж у 3 рази. В результаті МННГ-мутагенезу було отримано мутанти, які і перевіряли на авермектинсинтезуючу здатність. Серед них відмічено появу як плюс (30%), так і мінус (70%) варіантів. Плюс-варіанти були в основному ті, що змінювали забарвлення середовища, продукуючи розчинний пігмент темно-коричневого кольору. Біосинтетична активність окремих варіантів зростала, зокрема у варіанта №54 вона була майже у 3 рази вищою від такої вихідного штаму *Streptomyces avermitilis* УKM Ас-2179.

Таким чином, встановлено, що штам *Streptomyces avermitilis* УKM Ас-2179 являє собою гетерогенну популяцію з досить великою кількістю варіантів, відмінних між собою як за типами колоній, так і за рівнем біосинтетичної активності. Така варіабельність підвищує ймовірність одержання позитивних результатів при проведенні подальшої селекційної роботи з метою відбору високопродуктивних варіантів. Шляхом мінливості вдалося підвищити активність природного штаму *Streptomyces avermitilis* УKM Ас-2179 з 957 мкг/мл до 2650 мкг/мл та відібрати варіант для подальшої роботи.

Висновки і перспективи.

Популяція штаму *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 після обробки його спорової суспензії мутагеном, виявилась досить гетерогенною. За дії МННГ на актинобактерії, спостерігається виражена зміна культурально-морфологічних ознак. Частота появи ауксотрофних мутантів на первинному етапі відбору становила 0,006%. Дані варіанти після реізоляції були придатними до ідентифікації їх ростових потреб та можуть бути використані в генетичних схрещуваннях. Прототрофні рекомбінанти від таких схрещувань часто мають підвищену біосинтетичну активність. З використанням індукованого мутагенезу вдалося підвищити активність вихідного штаму *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 у 2,7 рази та відібрати варіант для подальшої роботи.

References

1. Saccà M.L., Barra Caracciolo A., Di Lenola M., Grenni P. Ecosystem services provided by soil microorganisms. In: Lukac, M., Grenni, P., Gamboni, M. (eds) Soil Biological Communities and Ecosystem Resilience. Sustainability in Plant and Crop Protection. Springer, Cham. 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63336-7_2
2. De Jesus Sousa JA, Olivares FL. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. Chem. Biol. Technol. Agric. 2017; 24:239–252. DOI:10.1186/s40538-016-0073-5
3. Dholakiya RN, Kumar R, Mishra A, Mody KH, Jha B. Antibacterial and antioxidant activities of novel Actinobacteria strain isolated from Gulf of Khambhat, Gujarat. Front Microbiol. 2017; 8:2420. doi:10.3389/fmicb.2017.02420
4. Golinska P, Wypij M, Agarkar G, Rathod D, Dahm H, Rai M. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. Antonie Van Leeuwenhoek. 2015;108(2):267-89. doi: 10.1007/s10482-015-0502-7.
5. Harir M, Bendif H, Bellahcene M, Fortas and Rebecca Pogni Z. Streptomyces Secondary Metabolites [Internet]. Basic Biology and Applications of Actinobacteria. IntechOpen; 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79890>
6. Alam K, Mazumder A, Sikdar S, Zhao Y-M, Hao J, Song C, Wang Y, Sarkar R, Islam S, Zhang Y, Li A. Streptomyces: The biofactory of secondary metabolites. Front. Microbiol. 2022, 13:968053. doi: 10.3389/fmicb.2022.968053
7. Klementz D, Döring K, Lucas X, Telukunta KK, Erxleben A, Deubel D, Erber A, Santillana I, Thomas OS, Bechthold A, Günther S. StreptomeDB 2.0--an extended resource of natural products produced by streptomycetes. Nucleic Acids Res. 2016; 44(D1):D509-14. doi: 10.1093/nar/gkv1319.
8. Valli S, Suvathi SS, Aysha OS, Nirmala P, Vinoth KP, Reena A. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. Asian Pac J Trop Biomed. 2012; 2(6):469-73. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60078-1.
9. Bilyavska LO. Actinobacteria of the genus Streptomyces and their metabolites in the bioregulation of plants: dissertation. ... doc. biological Sciences: 03.00.07. Kyiv, 2018. 485 p.
10. Jones GH. Streptomyces RNases – Function and impact on antibiotic synthesis. Front. Microbiol. 2023; 14:1096228. doi: 10.3389/fmicb.2023.1096228
11. Cheng J, Park SB, Kim SH, Yang SH, Suh JW, Lee CH, Kim JG. Suppressing activity of staurosporine from Streptomyces sp. MJM4426 against rice bacterial blight disease. J Appl Microbiol. 2016; 120(4):975-

85. doi: 10.1111/jam.13034
12. Hamed J, Mohammadipanah F. Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2015; 42(2):157-71. doi: 10.1007/s10295-014-1537-x.
13. Iutynska GO, Tytova LV, Leonova NO, Antypchuk AF, Brovco IS, Eakin D, Valahurova HV, Kozrytska VE, Biliavska LO, Petruk TV, Ponomarenko S.P, Yamborko NA, Pindrus AA Complex preparations based on microorganisms and plant growth regulators. In: Iutynska GO, Ponomarenko SP (eds). *New plant growth regulators: basic research and technologies of application*. Kyiv: Nichlava; 2011:161-208.
14. Pastor V, Luna E, Mauch-Mani B, Ton J, Flors V. Primed plants do not forget, *Environmental and Experimental Botany*. 2013; 94:46-56. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.02.013>.
15. El-Saber Batiha G, Alqahtani A, Ilesanmi OB, Saati AA, El-Mleeh A, Hetta HF, Magdy Beshbishy A. Avermectin Derivatives, Pharmacokinetics, Therapeutic and Toxic Dosages, Mechanism of Action, and Their Biological Effects. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020;13(8):196. doi: 10.3390/ph13080196.
16. Wang L., Yan X., Li Y, Gao C, Liu J. Preparation and Characterization of Avermectin B2 Microcapsules and Effective Control of Root-Knot Nematodes. *ACS Omega*. 2023; 8(14): 13038-13047. DOI: 10.1021/acsomega.3c00244
17. Iutynska GO, Biliavska LO, Kozrytska VE. Development strategy for the new environmentally friendly multifunctional bioformulations based on soil streptomycetes. *Micro. J.* 2017; 79(1):22-33. DOI:10.15407/microbiolj79.01.022
18. Petruk TV, Biliavs'ka LO, Kozryts'ka Vle, Mukvykh MS. Increasing biosynthesis of avermectins of *Streptomyces avermitilis* UCM Ac 2161 under the effect N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mikrobiol Z.* 2004; 66(6):24-30. Ukrainian. PMID: 15765867.
19. Dashwood RH. Cancer interception by interceptor molecules: mechanistic, preclinical and human translational studies with chlorophylls. *Genes and Environ*. 2021; 43:8. <https://doi.org/10.1186/s41021-021-00180-8>
20. Martín JF. Molecular mechanisms for the control by phosphate of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*. 2020:213-237. <https://doi.org/10.1201/9781003068600-6>
21. Vinogradov AA, Suga H. Introduction to thiopeptides: biological activity, biosynthesis, and strategies for functional reprogramming. *Cell Chemical Biology*. 2020; 27(8):1032-1051. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.07.003>.
22. Chen J, Liu M, Liu X, Miao J, Fu C, Gao H, Müller R, Zhang Q, Zhang L. Interrogation of *Streptomyces avermitilis* for efficient production of avermectins. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2016; 1(1):7-16. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.03.002>.
23. Alef K, Nannipieri P. Soil respiration. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. New York: *Academic Press*; 1995. 214–218.
24. Fedorenko VO, Ostash BO, Gonchar MV, Rebets YuV. Large workshop on genetics, genetic engineering and analytical biotechnology of microorganisms. Lviv: Ivan Franko LNU Publishing Center, 2007. 279 p.
25. Rütten A, Kirchner T, Musiol-Kroll EM. Overview on Strategies and Assays for Antibiotic Discovery. *Pharmaceuticals*. 2022; 15(10):1302. <https://doi.org/10.3390/ph15101302>

**Serhiychuk N., Biliavska L., Kolomiets Yu., Zinchenko L., Ilyuk N. (2024)
THE INFLUENCE OF N-METHYL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINE ON AVER-
MECTIN SYNTHESIS ABILITY OF STREPTOMYCES AVERMITILIS UKM AS-2179
AND APPEARING AUXOTROPHIC MUTANTS.**

BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 15(2): 5-16.

<https://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/49736>

[http://dx.doi.org/10.31548/biologiya15\(2\).2024.001](http://dx.doi.org/10.31548/biologiya15(2).2024.001)

Abstract. An important way to transition to ecologically safe agrotechnologies is the abandonment of chemical means of plant protection and the transition to biological ones. The effectiveness of the use of chemical means of plant protection is gradually decreasing, which is connected with the emergence of resistant populations of pests and pathogens. The aim of the presented work was to study the influence of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine on the survival and isolation of highly active variants of *S. avermitilis* UKM As-2179, the avermectin-synthesizing activity of which would be higher than that of the original strain.

Biochemical methods of determining avermectin-synthesizing activity were used in the work, the qualitative assessment of the culture's ability to synthesize avermectins was performed by the TLC method, and the concentration of avermectins in ethanol extracts was determined by the colorimetric method. The influence of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine on the viability and antibiotic activity of the avermectin complex producer *S. avermitilis* UKM As-2179 was studied. It was found that the optimal time for obtaining clones with increased antibiotic activity is 15 minutes of treatment with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, during which 30% of the spores of the studied strain survive, and the biosynthetic activity increases by 2.7 times. To identify clones of *S. avermitilis* UKM As-2179 with increased synthesis of natural avermectins, the method of induced MHHF mutagenesis can be used.

Key words: *Streptomyces avermitilis*, avermectins, N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, mutant.