

УДК 606:579.6(082)

CREATING A COLLECTION OF PROMISING STRAINS OF EXTREMOPHILIC ACTINOMYCETE - PRODUCERS OF ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ANTIBIOTICS

L.P. Trenochnikova, S.A. Aytkeldieva, A.Kh. Khasenova, G.D. Ultanbekova

Institute of Microbiology and Virology, SC MES RK, Almaty

Key words: extremophilic actinomycetes, collection of microorganisms, gram-positive and gram-negative bacteria, filamentous fungi, physiological and biochemical properties, antagonistic activity

Abstract. Biological properties of 16 extremophilic actinomycete strains, selected to form a collection of potentially valuable for medicine microorganisms, have been studied. High levels of lecithinase, amylolytic and gelatinous activity have been established. All collection of strains of extremophilic actinomycetes possess antagonistic activity against gram-positive bacteria (*S. aureus*), 31.3% of them develop antagonism against gram-negative bacteria (*E.coli*), 50.0% of strains - against filamentous fungi (*Aspergillus niger*)

УДК 606:579.6(082)

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ АКТИНОМИЦЕТОВ - ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И АНТИФУНГАЛЬНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Л.П. Треножникова, С.А. Айткельдиева, А.Х. Хасенова, Г.Д. Ултанбекова

Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, г. Алматы

Ключевые слова: экстремофильные актиномицеты, коллекция микроорганизмов, грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, мицелиальные грибы, физиолого-биохимические и антагонистические свойства

Аннотация. Изучены биологические свойства 16 штаммов экстремофильных актиномицетов, отобранных для создания коллекции микроорганизмов, потенциально ценных для медицины. Установлен высокий уровень лецитиназной, амилолитической и желатинозной активности. Все коллекционные штаммы экстремофильных актиномицетов обладают антагонизмом против грамположительных микроорганизмов (*S. aureus*), 31,3% из них проявляют антагонизм против грамотрицательных микроорганизмов (*E.coli*), 50,0% штаммов – против мицелиальных грибов (*Aspergillus niger*)

В настоящее время основным методом борьбы с патогенными и условно-патогенными бактериями – возбудителями инфекционных заболеваний является использование различных групп химиопрепаратов с выраженной антибактериальной активностью, наиболее эффективными из которых, по-прежнему, остаются природные антибиотики и их синтетические аналоги [1-3]. Повсеместно применяемая антибиотикотерапия имеет ряд негативных последствий, одно из которых проявляется в формировании резистентности микроорганизмов к еще недавно успешно применяемым лекарственным средствам. Появились штаммы патогенных бактерий, одновременно устойчивые к нескольким антибиотикам, т.е. обладающие множественной резистентностью [4,5]. Рост числа лекарственно-устойчивых возбудителей и ограниченный успех таких стратегий, как возможности комбинаторной химии в обеспечении медицины новыми активными агентами, дает неопределенный прогноз на будущее антимикробной терапии. Отсутствие новых классов антибиотиков в сочетании с повышенной устойчивостью к антибиотикам возбудителей инфекций требует незамедлительного скрининга новых природных соединений, имеющих новые механизмы действия и способных заменить уже применяемые лекарственные препараты, теряющие свою эффективность. Очень важно, чтобы группы микроорганизмов из малоизученных экстремальных мест обитания исследовались как источники новых классов антибиотиков и других низкомолекулярных терапевтических агентов [6]. Поэтому изучение антимикробных свойств

экстремофильных актиномицетов из экосистем Казахстана является перспективным для обнаружения новых природных лекарственных веществ.

Целью данного исследования было создание коллекции штаммов экстремофильных актиномицетов, выделенных из экосистем Казахстана, потенциально ценных для медицины.

Материалы и методы. Изучение культурально-морфологических признаков штаммов экстремофильных актиномицетов проводили на 10 сутки роста с использованием модифицированного агара Беннета № 1 и 2. Состав сред приведен в г/л.

Вариант агара Беннета № 1: глюкоза - 2,0; дрожжевой экстракт - 1,0; пептон - 2,0; pH 7,2;

Вариант агара Беннета № 2: глюкоза - 2,0; дрожжевой экстракт - 1,0; пептон - 2,0; NaCl - 50,0; pH 7,2

Отмечали цвет, характер и степень развития воздушного мицелия, окраску субстратного мицелия, для объективной оценки окраски использовали шкалу цветов А.С.Бондарцева (7).

Физиолого-биохимические признаки штаммов актиномицетов исследовали с использованием общепринятых методик (8).

Тест на расщепление тирозина проводили на тирозиновом агаре состава (%): пептон-0,5; мясной экстракт-0,3; агар-2,0; L-тирозин-0,5.

Для определения желатиназной активности питательную 20 % желатину засеивали культурами актиномицетов и инкубировали при температуре 28-30°C.

Амилолитическую активность определяли по зонам просветления на крахмальном агаре состава (%): крахмал растворимый - 1,0; NaNO₃-0,1; K₂HPO₄-0,3; NaCl-0,05; MgCO₃-0,1; агар-1,5.

Лецитиназную активность определяли на среде следующего состава (%): пептон-0,1; дрожжевой экстракт-0,5; NaCl-0,1; агар-1,5 с добавлением яично-желточной эмульсии.

Коагуляцию и пептонизацию молока исследовали при засеивании культур в обезжиренное молоко и инкубировании в термостате при температуре 28°C.

При определении целлюлолитической активности на фильтровальную бумагу наносили исследуемые культуры и выращивали в колбах Эрленмейера на круговой качалке (180-200 об/мин.) на среде Гетчинсона состава (%): K₂HPO₄-0,1; CaCl₂-0,01; MgSO₄-0,03; NaCl-0,01; FeSO₄-0,001; NaNO₃-0,25.

Образование сероводорода актиномицетами изучали на среде (%): агар с пептоном и железом - 3,6; дрожжевой экстракт- 0,1; pH 7,0-7,2. Инкубировали при 28°C от 15 до 20 часов.

Антагонистические свойства актиномицетов изучали методом агаровых блоков (9) в отношении метициллинрезистентного штамма *S. aureus* ИМВ 3316, *E.coli* J53 рMG 223, *Aspergillus niger*.

Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок (10).

Результаты и их обсуждение. На основании изучения антагонистических и физиолого-биохимических свойств проведен отбор 16 штаммов перспективных экстремофильных актиномицетов для формирования коллекции. Данные по источнику получения отобранных штаммов экстремофильных актиномицетов приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Происхождение коллекционных штаммов экстремофильных актиномицетов

Номер штамма	Место забора	Среда обитания	Экосистема	Тип почвы
КС2-2	Ауеликольский р-н, Кустанайская область	Наземная	Степной бор	Солончак соровый
КС2-20	Ауеликольский р-н, Кустанайская область	Наземная	Степной бор	Солончак соровый
КС4-6	Ауеликольский р-н, Кустанайская область	Водная	Степной бор	Солончак соровый
КС5-5	Ауеликольский р-н, Кустанайская область	Наземная	Степной бор	Солончак соровый
КС5-12	Ауеликольский р-н, Кустанайская область	Наземная	Степной бор	Солончак соровый
КС8-1	Ауеликольский р-н, Кустанайская область	Наземная	Степной бор	Солончак соровый
КС13-5	Мендыкаринский р-н, Кустанайская область	Наземная	Степь	Солонец лугово-степной
КС16-16	Мендыкаринский р-н, Кустанайская область	Водная	Степь	Солончак соровый
КС19-4	Мендыкаринский	Наземная	Степь	Солончак соровый

	р-н, Кустанайская область			
КС22-10	Мендыкаринский р-н, Кустанайская область	Наземная	Степь	Солончак луговой
КС27-17	Мендыкаринский р-н, Кустанайская область	Наземная	Степь	Солончак луговой
КС31-15	Мендыкаринский р-н, Кустанайская область	Наземная	Степь	Солончак соровый
КЮ9-9	Балхашский р-н, Алматинская область	Наземная	Степь	Солончак луговой
КЮ14-4	Балхашский р-н, Алматинская область	Наземная	Глинистая пустыня	Солончак типичный
КЮ34-29	Балхашский р-н, Алматинская область	Наземная	Песчаная пустыня	Солончак соровый
КЮ36-1	Балхашский р-н, Алматинская область	Наземная	Степь	Солончак типичный

Проведена первичная идентификация коллекционных штаммов экстремофильных актиномицетов на основе изучения их культурально-морфологических признаков (таблица 2). Все отобранные штаммы являются представителями рода *Streptomyces*.

Таблица 2 – Культурально-морфологические свойства коллекционных штаммов экстремофильных актиномицетов

Номер штамма	Среда	Окраска воздушного мицелия	Окраска субстратного мицелия	Идентификация
КС2-2	Агар № 1	Беловато-серый	Буро-коричневый	<i>Streptomyces sp.</i>
КС2-20	Агар № 1	Светло-серый	Желтовато-бурый	<i>Streptomyces sp.</i>
КС4-6	Агар № 1	Светло-серый	Светло-оливковый	<i>Streptomyces sp.</i>
КС5-5	Агар № 1	Светло-серый	Светло-оливковый	<i>Streptomyces sp.</i>
КС5-12	Агар № 1	Светло-оливковый	Оливковый	<i>Streptomyces sp.</i>
КС8-1	Агар № 2	Белый	Бесцветный	<i>Streptomyces sp.</i>
КС13-5	Агар № 1	Светло-кремовый	Желтовато-бурый	<i>Streptomyces sp.</i>
КС16-16	Агар № 1	Светло-серый	Коричнево-оливковый	<i>Streptomyces sp.</i>
КС19-4	Агар № 1	Белый	Буроватый	<i>Streptomyces sp.</i>
КС22-10	Агар № 2	Светло-желтый	Ярко-желтый	<i>Streptomyces sp.</i>
КС27-17	Агар № 2	Светло-кремовый	Желто-коричневый	<i>Streptomyces sp.</i>
КС31-15	Агар № 1	Светло-серый	Желтовато-бурый	<i>Streptomyces sp.</i>
КЮ9-9	Агар № 1	Серый	Буровато-желтый	<i>Streptomyces sp.</i>
КЮ14-4	Агар № 1	Светло-серый	Темно-желтый	<i>Streptomyces sp.</i>
КЮ34-29	Агар № 2	Белый	Светло-бурый	<i>Streptomyces sp.</i>
КЮ36-1	Агар № 1	Беловато-серый	Бесцветный	<i>Streptomyces sp.</i>

Установлено, что коллекционные штаммы экстремофильных актиномицетов обладают высокой ферментативной активностью, которая наиболее выражена в отношении таких субстратов, как лецитин, крахмал и желатин (таблица 3).

Таблица 3 – Физиолого-биохимические свойства коллекционных штаммов экстремофильных актиномицетов

Номер штамма	Физиолого-биохимические свойства									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
КС2-2	-/-	-/-	+///	+/-	-/-	-/+	-/-	+/-	-/-	-/-
КС2-20	-/-	-/-	+//	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/+
КС4-6	+/-	-/-	+++//+	+//	-/-	-/-	+++//	-/-	-/-	-/-
КС5-5	+/-	-/-	-//+	+//	+//	-/+	+++//	-/-	-/-	-/-
КС5-12	+/-	+/-	+////	+/-	-/-	-/-	+++//	-/+	-/+	-/-
КС8-1	+/-	-/-	+++//+	-/-	-/-	-/+	+++//	-/-	-/-	+/-
КС13-5	-/-	+++//+	+//+	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-
КС16-16	-/-	+++//+	+////	-/-	-/-	+/-	-/-	-/+	-/-	-/-
КС19-4	-/-	-/-	+//+	+++//	+/-	-/-	+++//	-/-	-/-	-/-
КС22-10	+/-	-/-	+++//+	-/-	-/-	+/-	+++//+	-/-	+/-	+/-
КС27-17	-/-	+++//	+////	+//	-/-	-/-	+++//	-/-	-/-	-/-
КС31-15	-/-	+//	+//+	-/-	-/-	-/+	+//	-/-	-/-	-/-
КЮ9-9	+/-	-/-	+++//+	+++//	-/+	-/-	+++//	-/-	-/-	-/-
КЮ14-4	+/-	+++//	+++//+	-/-	-/-	+//	+++//	-/-	-/-	-/-
КЮ34-29	-/-	-/-	+//+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
КЮ36-1	+/-	+++//	+++//+	-/-	-/-	+//	+//	-/-	-/-	-/-

Примечание: 1) Физиолого-биохимические свойства: 1 - расщепление тирозина, 2 - гидролиз крахмала, 3 - разжижение желатина, 4 - коагуляция молока, 5 - пептонизация молока, 6 - разложение целлюлозы, 7 - расщепление лецитина, 8 - редукция нитратов, 9 - денитрифицирующая способность, 10 – образование сероводорода

2) +++ высокая активность; ++ умеренная активность; + слабая активность; - отсутствие активности;
 3) В числителе – нейтральные условия, pH 7,0; в знаменателе - соленые условия, 5% NaCl, pH 7,0

Лецитиназную активность проявляет 75% штаммов, из них 83,3% обладают умеренной и высокой лецитиназной активностью. 50% штаммов экстремофильных актиномицетов обладают тирозиназной активностью, 43,8% штаммов проявляют амилитическую активность, 31,3% штаммов – целлюлолитическую активность, все штаммы экстремофильных актиномицетов имеют желатиназную активность. Штаммы КС5-5, КС19-4, КЮ9-9 пептонизируют молоко, штаммы КЮ9-9, КС13-5 образуют сероводород. Установлено, что многие штаммы экстремофильных актиномицетов проявляют ферментативную активность также на среде, содержащей 5% NaCl. Более всего в соленых условиях среды выражена желатиназная, амилитическая, целлюлолитическая активность и пептонизация молока. Расщепление тирозина и образование сероводорода в соленых условиях отсутствует, лецитиназная активность проявляется слабее. Интересным является факт появления целлюлолитической активности у штаммов экстремофильных актиномицетов в соленых условиях при его отсутствии в условиях нейтральной среды. Это свидетельствует о перестройке биохимических процессов жизнедеятельности микроорганизмов при изменении условий существования для использования новых питательных субстратов.

Антагонистические свойства коллекционных штаммов экстремофильных актиномицетов приведены в таблице 4. Среди коллекционных штаммов актиномицеты IA подгруппы, проявляющие антагонизм в трех средах обитания (нейтральной, соленой и щелочной) в отношении *S. aureus* ИМВ 3316, составляли 81,3%, актиномицеты IB подгруппы (антагонизм в двух средах обитания) – 18,7%. Все коллекционные штаммы актиномицетов обладают антагонизмом против грамположительных микроорганизмов (*S. aureus*), 31,3% из них проявляют антагонизм против грамотрицательных микроорганизмов, 50,0% штаммов – против мицелиальных грибов.

Таблица 4 – Антагонистические свойства коллекционных штаммов экстремофильных актиномицетов

МовНомер штамма	Диаметр зоны подавления роста тест-микроорганизмов, мм								
	<i>S. aureus</i> ИМВ 3316			<i>E. coli</i> J53 pMG223			<i>Aspergillus niger</i>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
КС2-2	38±0,2	33±0,1	24±0,1	15±0,1	0	0	0	0	0
КС2-20	35±0,1	28±0,1	0	20±0,1	0	0	0	10±0,1	12±0,2
КС4-6	23±0,1	38±0,2	16±0,2	22±0,1	33±0,2	16±0,1	0	19±0,2	0
КС5-5	19±0,2	31±0,1	16±0,2	0	0	0	9±0,1	20±0,3	15±0,3
КС5-12	26±0,2	40±0,2	25±0,3	25±0,3	48±0,3	15±0,1	9±0,1	19±0,3	13±0,2
КС8-1	48±0,1	50±0,3	20±0,1	0	0	0	0	0	0
КС13-5	36±0,1	34±0,1	43±0,3	0	0	0	0	0	0
КС16-16	33±0,1	26±0,1	22±0,1	0	0	0	0	0	0
КС19-4	26±0,3	31±0,1	12±0,1	0	0	0	13±0,1	0	15±0,2
КС22-10	47±0,3	53±0,3	45±0,3	0	0	0	0	0	0
КС27-17	30±0,2	55±0,3	23±0,1	0	0	0	0	16±0,3	15±0,2
КС31-15	15±0,1	20±0,1	0	0	0	0	28±0,2	30±0,3	0
КЮ9-9	30±0,2	43±0,3	20±0,1	17±0,1	35±0,2	1±0,15	0	0	0
КЮ14-4	42±0,3	47±0,3	40±0,2	0	0	0	0	0	0
КЮ34-29	0	32±0,1	22±0,1	0	0	0	0	18±0,1	10±0,1
КЮ36-1	34±0,1	36±0,1	34±0,2	0	0	0	0	0	0

Примечание: 1- вариант агара Беннета №1; 2 - вариант агара Беннета №2; 3 - вариант агара Беннета №3

Таким образом, создана коллекция из 16 штаммов экстремофильных актиномицетов, которые обладают высокими деструктивными и антагонистическими свойствами. Коллекционные штаммы являются перспективными объектами для фарминдустрии Республики Казахстан с целью разработки новых лекарственных соединений для медицины.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Сазыкин Ю.О. Современные пути поиска новых антибактериальных агентов: предложения и дискуссии // Антибиотики и химиотерапия. - 1998. - Т. 43, № 12. - С. 4-7.
- [2] Berdy J. Bioactive microbial metabolites: a personal view // J. Antibiot. – 2005. - Vol.58, № 1. – P. 1–26.
- [3] Lam K.S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes // Curr. Opin.Microbiol. - 2006. - Vol. 9. – P. 245-251.
- [4] Enright M.C. The evolution of a resistant pathogen the case of MRSA // Curr. Opin.Pharmacol. – 2003. – Vol. 3. – P. 474-479.

- [5] Cardo D., Horan T., Andrus M. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System // *Am.J.Infect. Control.* – 2004. - Vol. 32. - P. 470-485.
- [6] Phoebe C.H., Cambie J., Albert F.G., Van Tran K., Cabrera J., Correira H.J., Guo Y., Lindermuth J. Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds // *J. Antibiotics.* – 2001. – Vol.54. – P.56-65.
- [7] Бондарцев А.С. Шкала цветов. М.: АН СССР, 1954, 31 с.
- [8] Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. - М.: «Агропромиздат», 1990. - 283 с.
- [9] Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. - М.: Наука, 2004. - 528 с.
- [10] Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М., 1975. – 295 с.

REFERENCES

- [1] Sazykin Ju.O. Sovremennye puti poiska novyh antibakterial'nyh agentov: predlozhenija i diskussii *Antibiotiki i himioterapija.* **1998**, T. 43, № 12, S. 4-7 (in Russ.).
- [2] Berdy J. Bioactive microbial metabolites: a personal view *J. Antibiot.* **2005**, Vol.58, № 1, P. 1–26.
- [3] Lam K.S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes *Curr. Opin.Microbiol.* , **2006**, Vol. 9, P. 245-251.
- [4] Enright M.C. The evolution of a resistant pathogen the case of MRSA *Curr. Opin.Pharmacol.* **2003**, Vol. 3, P. 474-479.
- [5] Cardo D., Horan T., Andrus M. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System *Am.J.Infect. Control.* **2004**, Vol. 32, P. 470-485.
- [6] Phoebe C.H., Cambie J., Albert F.G., Van Tran K., Cabrera J., Correira H.J., Guo Y., Lindermuth J. Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds *J. Antibiotics.* **2001**, Vol.54, P.56-65.
- [7] Bondarcev A.S. Shkala cvetov. *M.: AN SSSR, 1954*, 31 s. (in Russ.).
- [8] Semenov S.M. Laboratornye sredy dlja aktinomicetov i gribov. *M.: «Agropromizdat», 1990*, 283s. (in Russ.).
- [9] Egorov N.S. Osnovy uchenija ob antibiotikah. *M.: Nauka, 2004*, 528 s. (in Russ.).
- [10] Urbah V.Ju. Statisticheskij analiz v biologicheskikh i medicinskih issledovanijah. *M., 1975*, 295s. (in Russ.).

БАКТЕРИЯЛАРҒА ЖӘНЕ САҢЫРАУҚҰЛАҚТАРҒА ҚАРСЫ АНТИБИОТИКТЕРДІ ТҮЗЕЙТІН ЭКСТРЕМОФИЛДІ АКТИНОМИЦЕТТЕРДІҢ ПЕРСПЕКТИВТІ ШТАМДАРЫНЫҢ ЖИНАҒЫН ҚҰРАСТЫРУ

Треножникова Л.П., Айткелдиева С.А., Хасенова А.Х., Ултанбекова Г.Д.
ЕМК «Микробиология және вирусология институты» ҒК БҒМ ҚР, Алматы

Тірек сөздер: Экстремофилді актиномицеттер, микроорганизмдер жиынтығы, грамоң және грамтеріс микроорганизмдер, мицелиалды саңырауқұлақтар, физиолого-биохимиялық және антагонистық белсенділігі

Аннотация. Экстремофилді актиномицеттердің 16 штаммының биологиялық белсенділігі зерттелді, олар медицина үшін пайдалы микроорганизмдер жиынтығын жасау үшін іріктелді. Лецитиназды, амилазды және желатиназды биік белсенділік деңгейге тағайындалды. Экстремофилді актиномицеттердің барлық коллекциондық штамдары грамоң микроорганизмдерге (*S. aureus*), қарсы антагонизм көрсетті. Олардың 31,3% грамтеріс (*E.coli*), микроорганизмдерге, 50,0% штаммы мицелиалды саңырауқұлақтарға (*Aspergillus niger*) қарсы белсенділігі айқындалды.

Поступила 11.08.2014 г.