

## NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 317 (2016), 149 – 153

L.P. Trenochnikova, G.D. Ultanbekova, A.S. Balgimbayeva,  
R.Sh. Galimbayeva, A.D. Masirbayeva

“Institute of Microbiology and Virology” of CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.  
E-mail: barahitian@yandex.ru

### RANGE OF ACTION OF THE ANTIBIOTIC FORMED BY THE STRAIN OF *STREPTOMYCES CANOFUMEUS* K-541

**Abstract.** A-541 antibiotic formed by *Streptomyces canofumeus* possesses high antifungal activity; MPK concerning *Candida guilliermondii* comprises 5-8 mkg/ml, phytopathogenic fungi of *Fusarium* sort – 2-3,5 mkg/ml, *Alternaria* – 3-4 mkg/ml, *Bipolaris* – 2,5-3,8 mkg/ml, *Aspergillus* – 2,7-4 mkg/ml, *Piricularia* – 2-3,5 mkg/ml. The antibiotic of A-541 is not active against Gram-negative and is poorly active concerning Gram-positive bacteria (MPK > 100 mkg/ml). The importation of A-541 antibiotic into a nutrient medium provides the complete inhibition of growth of the studied phytopathogenic fungi in neutral and alkaline conditions. At salinization of the environment the complete inhibition of radial growth of strains of *Fusarium oxysporum* ASP-3 and *Aspergillus niger* No. 1 is observed, growth of strains of *Pyricularia oryzae* KLR-8, *Alternaria alternata* No. 10, *Bipolaris sorokiniana* No. 16 is inhibited for 81,5-83,3%.

**Keywords:** streptomycete, antifungal activity, growth-stimulating activity, cereal crops, salt stress.

УДК 621.13.35

Л. П. Треножникова, Г. Д. Ултанбекова, А. С. Балгимбаева,  
Р. Ш. Галимбаева, А. Д. Масирбаева

Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан

### СПЕКТР ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКА, ОБРАЗУЕМОГО ШТАММОМ *STREPTOMYCES CANOFUMEUS* K-541

**Аннотация.** Антибиотик А-541, образуемый *Streptomyces canofumeus*, обладает высокой антифунгальной активностью; МПК в отношении *Candida guilliermondii* составляет 5-8 мкг/мл, фитопатогенных грибов рода *Fusarium* – 2-3,5 мкг/мл, *Alternaria* – 3-4 мкг/мл, *Bipolaris* – 2,5-3,8 мкг/мл, *Aspergillus* – 2,7-4 мкг/мл, *Piricularia* – 2-3,5 мкг/мл. Антибиотик А-541 неактивен против грамотрицательных и слабоактивен в отношении грамположительных бактерий (МПК > 100 мкг/мл). Внесение антибиотика А-541 в питательную среду обеспечивает полное ингибирование роста изученных фитопатогенных грибов в нейтральных и щелочных условиях. При засолении среды отмечено полное ингибирование радиального роста штаммов *Fusarium oxysporum* АСП-3 и *Aspergillus niger* № 1, рост штаммов *Pyricularia oryzae* КЛР-8, *Alternaria alternata* № 10, *Bipolaris sorokiniana* № 16 ингибируется на 81,5-83,3%.

**Ключевые слова:** стрептомицет, антифунгальная активность, ростстимулирующее действие, зерновые культуры, солевой стресс.

Антибиотические соединения широко используются в медицине, в сельском хозяйстве, в пищевой и консервной промышленности, а также в научных исследованиях [1-3]. Антибиотики являются перспективными агентами биоконтроля и находят все возрастающее применение в борьбе с фитопатогенными организмами – возбудителями заболеваний растений, наносящими существенный урон сельскохозяйственному производству [4, 5]. С экологической точки зрения,

перспективным является постепенное замещение химических фунгицидов на естественные экологически чистые препараты, в том числе микробные метаболиты. Разработка и применение таких препаратов позволит значительно повысить адаптивные способности сельскохозяйственных растений в разных экологических условиях, включая почвенное засоление и увеличить продуктивность растениеводства.

Количество описанных к настоящему времени индивидуальных природных веществ с антимикробными свойствами приближается к двадцати тысячам. По своей химической природе антибиотиков представляют собой низкомолекулярные органические вещества, относящиеся к различным классам химических соединений. Антибиотики, в отличие от других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, имеют два характерных свойства [6]: проявляют высокую биологическую активность по отношению к чувствительным к ним организмам и обладают избирательностью действия. Причем, каждый антибиотик характеризуется своим специфическим спектром действия. Изучение антибактериальных и антигрибковых свойств новых природных антибиотиков в отношении лабораторных и клинических тест-микроорганизмов является важным и необходимым этапом, позволяющим сделать вывод о целесообразности их дальнейшего исследования и выбрать нужное направление их применения в народном хозяйстве.

Целью работы было изучение спектра действия антибиотика А-541, представляющего интерес для разработки биопрепарата с антифунгальными свойствами.

**Объекты и методы исследований.** Объектом исследований являлся штамм *Streptomyces canofumeus* К-541, изолированный из солончаковой почвы Северного Казахстана. Штамм К-541, обладающий антифунгальными свойствами, отобран для разработки биопрепарата с целью биоконтроля грибковых заболеваний зерновых культур в разных экологических условиях.

Для получения спорового материала штамм *Streptomyces canofumeus* К-541 выращивали в течение 10 суток при температуре 28 °С на минеральном агаре 1 Гаузе или сахарозо-дрожжевом агаре Чапека. Готовили инокулом спор в концентрации 10<sup>9</sup> и проводили засев жидкой ферментационной среды с овсяной мукой (1 мл инокулома на 100 мл питательной среды).

Состав ферментационной среды: глюкоза - 15,0; овсяная мука - 15,0; CaCO<sub>3</sub> - 2,5; NaCl - 5,0; рН 7,0-7,2.

Биосинтез антибиотика А-541 осуществляли в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл в объеме среды 100 мл на круговой качалке (180-200 об/мин) при температуре 28 °С в течение 120 часов.

Антибиотик А-541 выделяли из биомассы штамма К-541 экстракцией этанолом. Взвешенную биомассу заливали 96% этанолом с модулем 1:3 (из расчета на 1 г биомассы 3 мл этанола). Экстракцию антибиотика А-541 проводили с использованием механической мешалки (RW 20 digital) в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем экстракцию продолжали в холодильнике при температуре 2–8 °С в течение 3 часов. Спиртовый экстракт отделяли от биомассы фильтрованием. Экстракт концентрировали в вакууме на ротационном испарителе марки IKARV10 basic при 35–40 °С, и антибиотическое вещество растворяли в этаноле. Из культуральной жидкости антибиотик извлекали экстракцией н-бутанолом (рН 7,0). Экстракт отделяли на делительной воронке, упаривали в вакууме и рекстрагировали этиловым спиртом.

Спектр действия антибиотика А-541 изучали в отношении грамположительных (*S. aureus* 209Р, *Bacillus anthracoides*, *Mycobacterium citreum*, *Mycobacterium rubrum*, *Corynebacterium* R-372), грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Comamonas terrigena* ATCC 8461), дрожжеподобных (*Candida guilliermondii*) и плесневых грибов-фитопатогенов (*Fusarium oxysporum* АСП-3, *F. oxysporum* КЛР-1, *F. heterosporum* АЛП-1, *Fusarium solani* АЛП-2, *F. sporotrichiella* № 5, *Aspergillus niger* № 1, *Pyricularia oryzae* КЛР-8, *Alternaria alternata* № 10, *Alternaria triticina* № 8, *Bipolaris sorokiniana* № 5, *Bipolaris sorokiniana* № 16).

Антимикробную и антифунгальную активность определяли методом диффузии в агар на питательном агаре для бактериальных и дрожжеподобных тест-микроорганизмов, для плесневых грибов использовали агар Чапека-Докса [6]. Для оценки антибиотической активности в чашках Петри, засеянных тест-культурами глубинным ростом (КОЕ 10<sup>6</sup>/мл), делали лунки с помощью стандартного бура (d = 7 мм), а затем в лунки пастеровской пипеткой вносили фильтрат нативного раствора или экстракт биомассы в количестве 0,1 мл. В качестве контроля использовали

стерильные чистые среды и этанол. Диаметр зон подавления роста бактериальных тест-микробов измеряли после инкубирования при температуре 37 °С в течение 24 часов, мицелиальных и дрожжеподобных грибов при температуре 25 °С в течение 72 часов. Все исследования выполняли в трех повторностях.

Антифунгальное действие антибиотика А-541 в разных экологических условиях определяли путем внесения этанольного экстракта антибиотиков на картофельно-декстрозный агар в соотношении 1 мл экстракта на 50 мл среды. Агар разливали в чашки Петри по 20 мл. Исследование проводили в нейтральных и альтернативных условиях роста фитопатогенных грибов: при внесении в агаровую среду 0,4% хлорида натрия или 0,2% бикарбоната натрия. Проводили посев фитопатогенных грибов методом укола по центру чашки и инкубировали посеы при температуре 25 °С в термостате. Учет результатов проводили, измеряя диаметр колоний грибов через 10 суток роста.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Препараты антибиотика – А-541-1 из культуральной жидкости и А-541-2 из биомассы,обладают одинаковым спектром действия, в высокой степени подавляя рост дрожжеподобных и мицелиальных грибов (рисунок 1).

Антимикробный спектр препаратов-сырцов антибиотика А-541 приведен в таблице 1. Антибиотик А-541 почти не активен в отношении грамположительных бактерий (МПК > 100 мкг/мл).

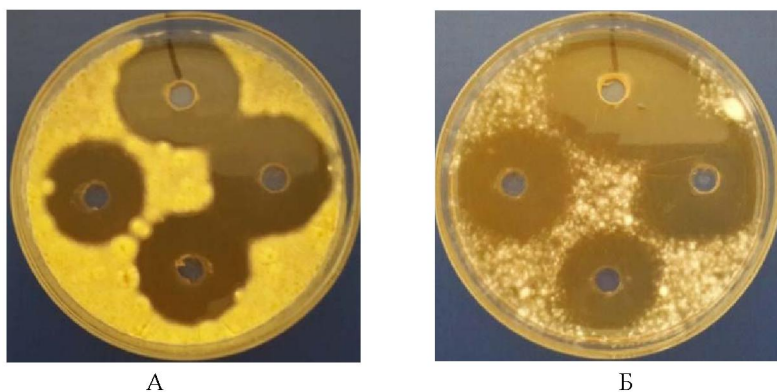


Рисунок 1 – Антифунгальная активность препарата антибиотика А-541-2 и его разведений в отношении фитопатогенных грибов: А – *Aspergillus niger* № 1 (лизис клеток и угнетение споруляции), Б – *Fusarium oxysporum* АСП-3

Таблица 1 – Антимикробный спектр антибиотика А-541

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл	
	Антибиотик А-541-1	Антибиотик А-541-2
<i>Commamonasterrigena</i> ATCC 8461	> 100	> 100
<i>Escherichia coli</i>	0	0
<i>Bacillus anthracoides</i>	> 100	> 100
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	> 100	> 100
<i>Mycobacterium citreum</i>	0	0
<i>Mycobacterium rubrum</i>	0	0
<i>Corynebacterium</i> R-372	0	0
<i>Candida guilliermondii</i>	8,0	5,0
<i>Aspergillus niger</i> № 1	4,0	2,7
<i>Fusarium sporotrichiella</i> № 5	3,5	2,0
<i>Fusarium oxysporum</i> АСП-3	3,5	2,0
<i>Fusarium oxysporum</i> КЖП-1	3,5	2,0
<i>Fusarium solani</i> АЖП-2	3,5	2,0
<i>Fusarium heterosporum</i> АЖП-1	3,5	2,0
<i>Alternaria tritici</i> № 8	4,0	3,0
<i>Alternaria alternata</i> № 10	4,0	3,0
<i>Bipolaris sorokiniana</i> № 5	3,8	2,5
<i>Bipolaris sorokiniana</i> № 16	3,8	2,5
<i>Pyricularia oryzae</i> КЖП-8	3,5	2,0

Антибиотик А-541 не проявляет активности против грамотрицательных и кислотоустойчивых бактерий. Комплексный препарат А-541-2, полученный из биомассы, обладает наиболее высокой активностью. МПК в отношении *Candidaguilliermondii* составляет 5,0 мкг/мл, в отношении фитопатогенных грибов рода *Fusarium* – 2,0 мкг/мл, рода *Alternaria* – 3,0 мкг/мл, рода *Bipolaris* – 2,5 мкг/мл, *Aspergillusniger* – 2,7 мкг/мл, *Pyriculariaoryzae* – 2,0 мкг/мл.

Изучена антифунгальная активность препарата антибиотика А-541-2 в отношении грибов родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Pyricularia*, *Bipolaris*, *Aspergillus* путем измерения радиального роста грибов на картофельно-декстрозном агаре с внесением антибиотика в среду культивирования. Полученные данные приведены в таблице 2 и в соответствии с рисунком 2. Показано, что внесение этанольного экстракта антибиотика А-541-2 из биомассы в количестве 1 мл на 50 мл среды обеспечивает полное ингибирование роста фитопатогенных грибов в нейтральных и щелочных условиях. При засолении среды культивирования для штаммов *Fusariumoxysporum* АСП-3 и *Aspergillusniger* № 1 отмечено полное ингибирование роста, для штаммов *Pyriculariaoryzae* КЛР-8, *Alternariaalternata* № 10, *Bipolarissorokiniana* № 16 наблюдалось ингибирование радиального роста на 81,5-83,3%.

Таблица 2 – Радиальный рост грибов на среде с антибиотиком А-541-2 (10 суток роста)

Фитопатогенные грибы	Варианты	Диаметр колоний фитопатогенных грибов, мм		
		Нейтральная среда	0,4% NaCl, pH 7,0	0,2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , pH 8,0
<i>Fusariumoxysporum</i> АСП-3	Контрольный	82 мм	80 мм	80 мм
	Опытный	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>Pyricularia oryzae</i> КЛР-8	Контрольный	75 мм	72 мм	65 мм
	Опытный	Нет роста	12 мм	Нет роста
<i>Alternariaalternata</i> № 10	Контрольный	65 мм	60 мм	60 мм
	Опытный	Нет роста	10 мм	Нет роста
<i>Bipolarissorokiniana</i> № 16	Контрольный	70 мм	65 мм	60 мм
	Опытный	Нет роста	12 мм	Нет роста
<i>Aspergillusniger</i> № 1	Контрольный	84 мм	78 мм	76 мм
	Опытный	Нет роста	Нет роста	Нет роста

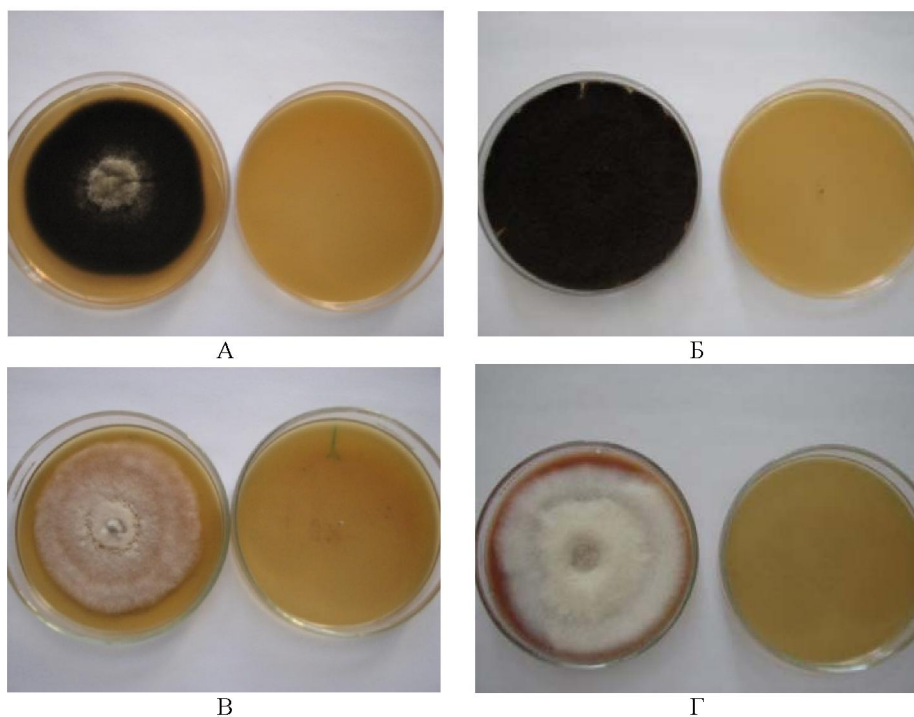


Рисунок 2 – Радиальный рост фитопатогенных грибов на картофельно-декстрозном агаре в нейтральных условиях (10 суток роста): А – *Pyriculariaoryzae* КЛР-8; Б – Д – *Aspergillusniger* № 1; В – *Bipolarissorokiniana* № 16; Г – *Fusariumoxysporum* АСП-3; 1 – контрольный вариант, 2 – опытный вариант (с внесением антибиотика А-541-2)

Таким образом, установлено, что метаболитный комплекс штамма *Streptomyces canofumeus* K-541 обладает высокой биологической активностью и эффективно подавляет рост и развитие фитопатогенных грибов, не проявляя при этом антибактериальную активность.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? // Arch. Microbiol. – 2001. – Vol. 176, N 5. – P. 386-390.
- [2] Berdy J. Bioactive microbial metabolites // J. Antibiot. – 2005. – Vol. 58. – P. 1-26.
- [3] Goodfellow M., Fiedler H.-P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics // Antonie van Leeuwenhoek. – 2010. – Vol. 98. – P. 119-142.
- [4] Sajid I., Fotso F., Yao C.B., Shaaban K.A., Hasnain S., Laatsch H. Antifungal and antibacterial activities of indigenous *Streptomyces* isolates from saline farmlands: prescreening, ribotyping and metabolic diversity // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – DOI: 10.1007/s11274-008-9928-7.
- [5] Mukesh Sharma. Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications // Int. J. Curr. Microbiol.App. Sci. – 2014. – Vol. 3(2). – P. 801-832.
- [6] Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 528 с.

#### REFERENCES

- [1] Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? // Arch. Microbiol. 2001. Vol.176, N 5. P. 386-390.
- [2] Berdy J. Bioactive microbial metabolites // J. Antibiot. 2005. Vol. 58. P. 1-26.
- [3] Goodfellow M., Fiedler H.-P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics // Antonie van Leeuwenhoek. 2010. Vol. 98. P. 119-142.
- [4] Sajid I., Fotso F., Yao C.B., Shaaban K.A., Hasnain S., Laatsch H. Antifungal and antibacterial activities of indigenous *Streptomyces* isolates from saline farmlands: prescreening, ribotyping and metabolic diversity // World J. Microbiol. Biotechnol. 2008. DOI: 10.1007/s11274-008-9928-7.
- [5] Mukesh Sharma. Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications // Int. J. Curr. Microbiol.App. Sci. 2014. Vol. 3(2). P. 801-832.
- [6] Egorov NS Fundamentals of theory of antibiotics. M.: MGU, 2004. 528 p.

**Л. П. Треножникова, Г. Д. Ұлтанбекова, А. С. Балғымбаева,  
Р. Ш. Галимбаева, А. Д. Масирбаева**

Микробиология және вирусология институты ҚР БҒМ ҒМ, Алматы, Қазақстан

#### **STREPTOMYCES CANOFUMEUS K-541 ШТАММЫМЕН ҚҰРЫЛҒАН АНТИБИОТИК СПЕКТРІНІҢ ҚИМЫЛЫ**

**Аннотация.** *Streptomyces canofumeus* қалыптасқан А-541 антибиотигі, жоғары антифунгалды белсенділікке ие, МПК *Candida guilliermondii* қарағанда 5-8 мкг/мл, фитопатогенді саңырауқұлақтар *Fusarium* тобы - 2-3.5 мкг/мл, *Alternaria* - 3-4 мкг/мл, *Bipolaris* - 2.5-3.8 мкг/мл, *Aspergillus* - 2.7-4 мкг/мл, *Piricularia* - 2-3.5 мкг/мл құрайды. Антибиотик А-541 граммтерге бактерияларға белсенді емес және граммоң бактерияларға нашар белсенділік көрсетеді (МПК > 100 мкг/мл). А-541 антибиотигін қоректік ортаға енгізгенде зерттелген фитопатогенді саңырауқұлақтар нейтральды және сілтілік жағдайға толық ингибирлену жағдайын жасайды. *Fusarium oxysporum* АСП-3 және *Aspergillus niger* № 1, *Piricularia oryzae* КЛР-8, *Alternaria alternate* № 10, *Bipolaris sorokiniana* № 16 штамдарына қоректік ортаның тұздануы, штамдардың толық радиальды өсуін 81,5-83,3% ингибирлейді.

**Түйін сөздер:** стрептомицет, антифунгалды белсенділік, өсуді тездететін әсер, астық дақылдары, тұзды стресс.