

БИОЛОГИЯ

МРНТИ 62.09.39, 34.45.05

А.Х.Хасенова¹, М.А.Ақылова², А.Ж.Султанова¹, А.Масирбаева¹

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
г. Алматы, Казахстан

² Центральная клиническая больница, г. Алматы, Казахстан

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АКТИНОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ РИЗОСФЕРЫ СИНЕГОЛОВНИКА

Аннотация. Изучен количественный и качественный состав микробоценозов ризосферы лекарственного растения синеголовника (*Eryngium*). В чистую культуру было выделено 78 изолятов актиномицетов, изучены их антагонистические свойства в отношении лабораторных штаммов *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и *Comamonas terrigena* ATCC 8461. Изоляты актиномицетов, проявившие высокую активность в отношении лабораторных тест-микроорганизмов, были проверены на действие против клинических тест-культур, чувствительных к используемым в клинике антибиотикам. 85,7% изолятов проявили активность в отношении грамположительных бактерий. Против грамотрицательных бактерий антагонизм проявили менее половины (42,9%) исследованных изолятов. Два изолята - С52 и С32 обладали высокой активностью как в отношении грамположительных, так и в отношении грамотрицательных бактерий.

Ключевые слова: ризосфера, грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии, актиномицеты, антагонистические свойства.

Түйіндеме. Кекбас шебінің (*Eryngium*) дерлік есімдіктік ризосферасы микробоценозының сандық және сапалық құрамы зерттелді. 78 изоляттан таза дақылдар белініп алынды, олардың *Bacillus subtilis* ATCC 6633 және *Comamonas terrigena* ATCC 8461 зертханалық штамдарына қарсы антагонистік қасиеттері зерттелді. Зертханалық тест-дақылдарға қарсы жоғары белсенділік керсететін, актиномицеттер изоляттары іріктеліп алынды. Клиникада қолданылатын антибиотиктерге сезімталдығы жоғары, тест-дақылдарға қарсы олардың белсенділігі зерттелді. Изоляттардың 85,7% грам оң бактерияларға қарсы белсенділік керсетті. Актиномицеттердің зерттеуге алынған изоляттарының жартысынан азырағы (42,9%) грамтеріс бактерияларға қарсы антагонизм керсетті. Екі ғана изолятта – С52 және С32,

грамоң, әрі грамтеріс бактерияларға да қарсы жоғары белсенділік болды.

Түйінді сөздер: ризосфера, грамоң, грамтеріс бактериялар, актиномицеттер, антагонистік қасиеттері...

• • •

Abstract. The article lays out the quantitative and qualitative composition of the microbiocenoses in rhizosphere of the medicinal plant fever-weed (*Eryngium*). 78 actinomycete isolates were isolated in pure culture, their antagonistic properties against laboratory strains of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Comamonas terrigena* ATCC 8461 were examined. Actinomycete isolates that showed high activity against laboratory test microorganisms were tested for activity against clinical test cultures that are susceptible to antibiotics used in clinic practice. 85.7% of isolates exhibited activity against gram-positive bacteria. Less than half of the tested isolates (42.9%) revealed antagonism against gram-negative bacteria. Two isolates, C52 and C32, were highly active against both gram-positive and gram-negative bacteria.

Keywords: rhizosphere, gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, actinomycetes, antagonistic properties

Введение. Антибиотики продолжают оставаться важнейшими препаратами для лечения инфекционных заболеваний человека. Устойчивость к используемым в клинике химиотерапевтическим препаратам является одной из наиболее серьезных угроз для здоровья человечества во всем мире. Особенно тревожным считается факт, что все больше возбудителей приобретают устойчивость сразу к нескольким видам антибиотиков [1, 2]. Данные Всемирной организации здравоохранения показывают, что число резистентных возбудителей инфекций постоянно увеличивается, и серьезные инфекции остаются глобальной проблемой здравоохранения в XXI столетии [3]. В последнее время устойчивые штаммы бактерий появляются гораздо быстрее, чем открытие новых антибиотиков. Согласно данным корейских исследователей, распространенность MRSA в 2009 г. достигла 63,7 % [4,5]. В исследованиях американского Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC) отмечалось, что в последнее время воз-

росла численность устойчивых грамотрицательных бактерий. Несмотря на то, что наиболее известными представителями полирезистентной грамотрицательной флоры являются *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* в настоящее время продолжает развиваться устойчивость у представителей семейства *Enterobacteriaceae* к большинству сильнодействующих антибиотиков, в том числе у госпитальных штаммов *Klebsiella*, *E. coli* и *Enterobacter* [6,7].

Одним из путей преодоления устойчивости возбудителей инфекций к антибиотикам является изыскание и внедрение в практику новых антибиотиков, а также получение производных известных антибиотиков. Микроорганизмы - основные продуценты лекарственных соединений, среди которых актиномицеты занимают лидирующее положение [8]. Однако темпы разработки и внедрения в практику новых антибиотиков отстают от темпов распространения резистентных к известным антибиотикам штаммов бактерий. Одним из важных этапов поиска и разработки новых антибиотиков является выделение актиномицетов-продуцентов из природных мест обитания. Основным источником их выделения является почва. Вместе с тем, актиномицеты распространены и в других, менее традиционных для выделения, экологических системах – пресной и морской воде, горячих источниках, ледниковых отложениях, а также в различных частях растений – корнях, листьях, стеблях и плодах [9-11]. Проведено исследование по изучению разнообразия актиномицетов ризосферы синеголовника и выявлению продуцентов биологически активных веществ.

Методы исследования. В результате исследований получено 8 образцов ризосферы лекарственного растения синеголовника (*Eryngium*), произрастающего в Балхашском и Капшагайском регионах и изучен состав их микробиоценозов.

Образцы ризосферы получали по методу последовательного отмывания корней [12]. Из каждого разведения делали посев не менее двух объемов по 0,1 куб. см на поверхность соответствующего агара. Посевы инкубировали в термостате при температуре 28°C в течение 10 дней. Результат выражали числом колониеобразующих единиц (КОЕ в 1 г почвы). Определение численности и таксономического состава актиномицетов в ризосфере проводили в свежих образцах. Поверхностный посев проводили в 3-кратной повторности на агаризованные среды [13] следующего состава (г/л):

1 среда: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -1; K_2HPO_4 -1; NaCl -1; MgSO_4 -1; крахмал-10; агар-агар-15. pH 7,2;

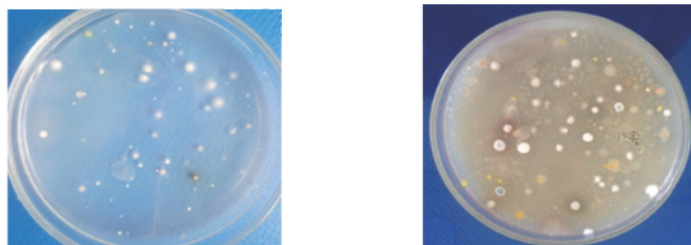
2 среда: KNO_3 -1; K_2HPO_4 -3; NaCl -0,2; MgCO_3 -0,3; FeSO_4 -0,001;
 CaCO_3 -10,5; крахмал-10;
агар-агар-15. pH 7,2;

3 среда: NaCl -5; CaCl_2 -0,5; пептон -5; кукурузный экстракт -5;
глюкоза -10; агар-агар-15.

Проведён анализ колоний актиномицетов по культурально-морфологическим признакам. Отмечали цвет, характер и степень развития воздушного мицелия, окраску субстратного мицелия, описывали форму колоний. Для объективной оценки окраски использовали шкалу цветов А.С.Бондарцева [14]. Серии и секции актиномицетов определяли согласно определителю Гаузе с соавторами [15]. Антагонистическую активность изучали в отношении лабораторных классических тест-микроорганизмов: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и *Comamonas terrigena* ATCC 8461 методом агаровых блоков [16]. Диаметр зоны ингибирования роста измеряли после инкубирования бактериальных тест-микроорганизмов при температуре 37°C в течение 24 ч.

Актиномицеты, обладающие антагонистической активностью в отношении лабораторных тест-микроорганизмов, исследовали в отношении клинических штаммов микроорганизмов, не обладающих резистентностью к существующим антибиотикам с целью отбора наиболее перспективных изолятов. Спектр антибиотической активности определяли в отношении следующих клинических бактерий - *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Micrococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*; *E. coli*; *Acinetobacter baumannii*.

Результаты исследования. Изучен количественный и качественный состав микробоценозов образцов ризосферы растения. Содержание актиномицетов на трех использованных питательных средах в общей сложности составило 93 колонии, из них в чистую культуру было отсеяно 78 изолятов. Доминирующими сериями являются *Chromogenes* и *Albus*, на питательных средах 2 и 3 встречаются актиномицеты серии *Coerulescens* и *Ruber*. (рисунок 1).



А

Б

А – рост на среде 1; Б – рост на среде 2

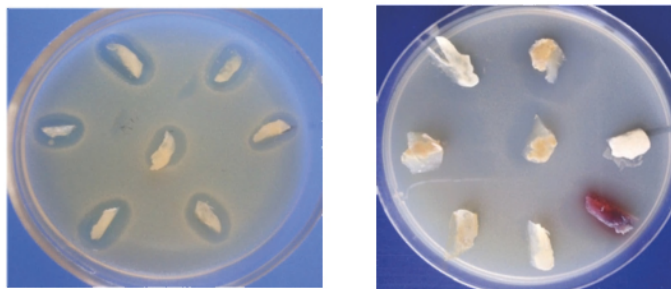
Рисунок 1 - Качественный состав актиномицетов ризосферы синеголовника (*Eryngium planum*) при выделении на разных средах

Каждую чистую культуру актиномицетов после достаточно хорошего развития проверяли на антагонистические свойства в отношении лабораторных штаммов *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и *Comamonas terrigena* ATCC 8461 (таблица 1, рисунок 2).

Таблица 1 – Антагонистические свойства актиномицетов, выделенных из ризосферы синеголовника (*Eryngium planum*)

| Номер изолята | Диаметр зоны подавления роста тест-микроорганизмов, мм | |
|---------------|--|--------------------------------------|
| | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | <i>Comamonas terrigena</i> ATCC 8461 |
| C2 | 15±0,1 | 0 |
| C6 | 25±0,1 | 18±0,2 |
| C12 | 15±0,2 | 0 |
| C15 | 18±0,1 | 15±0,2 |
| C19 | 18±0,3 | 0 |
| C21 | 23±0,1 | 20±0,1 |
| C23 | 28±0,1 | 25±0,2 |
| C27 | 22±0,2 | 18±0,3 |
| C32 | 35±0,4 | 28±0,1 |
| C33 | 18±0,1 | 15±0,3 |
| C36 | 27±0,3 | 22±0,2 |
| C40 | 22±0,1 | 18±0,1 |
| C41 | 23±0,2 | 25±0,3 |
| C42 | 20±0,1 | 17±0,1 |
| C47 | 15±0,3 | 0 |
| C50 | 13±0,1 | 0 |

| | | |
|-----|--------|--------|
| C52 | 30±0,4 | 25±0,2 |
| C55 | 22±0,1 | 18±0,3 |
| C59 | 13±0,1 | 0 |
| C60 | 20±0,1 | 15±0,1 |
| C63 | 26±0,2 | 20±0,3 |
| C65 | 15±0,1 | 15±0,1 |
| C67 | 18±0,2 | 14±0,2 |
| C69 | 14±0,1 | 0 |
| C71 | 25±0,1 | 20±0,2 |
| C72 | 20±0,4 | 15±0,3 |
| C74 | 20±0,1 | 17±0,2 |
| C77 | 16±0,1 | 0 |
| C78 | 21±0,2 | 18±0,1 |



А

Б

А-тест-культура *B. subtilis* ATCC 6633; Б -тест-культура *Comamonas terrigena* ATCC 8461

Рисунок 2 - Антибактериальная активность изолятов актиномицетов ризосферы синеголовника (*Eryngium planum*)

В отношении *Bacillus subtilis* ATCC 6633 проявили высокую активность 17 изолятов актиномицетов (диаметр зоны подавления роста составил 20 мм и более). Установлено, что 8 изолятов актиномицетов не проявили антагонизма в отношении *Comamonas terrigena* ATCC 8461. Наибольшую активность в отношении тест-культуры *Bacillus subtilis* ATCC 6633 проявили изоляты С32 (35±0,4) и С52 (30±0,4), в отношении *Comamonas terrigena* ATCC 8461 - С32 (28 мм) и С52, С23 (25 мм). Антагонистическими свойствами не обладали 28 изолятов актиномицетов, 20 изолятов показали низкую активность (10 мм и меньше) и не представлены в таблице.

Изоляты актиномицетов, проявившие высокую активность в отношении лабораторных тест-микроорганизмов, были отобраны для изучения биологических свойств в отношении клинических тест-микроорганизмов. Из бактериологической лаборатории инфекционной больницы были получены клинические штаммы грамположительных - *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus spp.* и грамотрицательных - *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii* возбудителей инфекционных болезней, не обладающих резистентностью к лекарственным препаратам. В таблице 2 показана антибактериальная активность изолятов актиномицетов ризосферы синеголовника в отношении клинических штаммов микроорганизмов.

Таблица 2 - Антибиотическая активность актиномицетов, выделенных из ризосферы синеголовника (*Eryngium planum*) в отношении клинических чувствительных штаммов

| Номер штамма | Диаметр зоны подавления роста тест-микроорганизмов, мм | | | | | |
|--------------|--|-----------------------|-------------------------|------------------------------|----------------|--------------------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>Micrococcus spp.</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>E. coli</i> | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| C6 | 24±0,1 | 21±0,1 | 23±0,3 | 0 | 0 | 0 |
| C15 | 18±0,1 | 15±0,3 | 15±0,2 | 0 | 0 | 0 |
| C21 | 23±0,1 | 20±0,2 | 22±0,1 | 156с±0,1 | 126с±0,2 | 0 |
| C23 | 28±0,1 | 24±0,3 | 25±0,2 | 20±0,2 | 15±0,4 | 10±0,3 |
| C27 | 22±0,2 | 18±0,1 | 22±0,2 | 0 | 0 | 0 |
| C32 | 33±0,4 | 30±0,2 | 32±0,3 | 27±0,1 | 23±0,3 | 22±0,2 |
| C33 | 186с±0,1 | 156с±0,4 | 136с±0,1 | 0 | 0 | 0 |
| C36 | 26±0,3 | 22±0,1 | 25±0,1 | 18±0,2 | 15±0,1 | 12±0,3 |
| C40 | 22±0,1 | 18±0,3 | 20±0,2 | 16±0,1 | 13±0,2 | 10±0,1 |
| C41 | 23±0,2 | 20±0,2 | 23±0,4 | 156с±0,3 | 156с±0,4 | 136с±0,2 |
| C42 | 20±0,1 | 17±0,2 | 19±0,1 | 0 | 0 | 0 |
| C52 | 30±0,4 | 30±0,1 | 31±0,1 | 25±0,2 | 24±0,2 | 23±0,4 |
| C55 | 22±0,1 | 18±0,3 | 21±0,2 | 18±0,3 | 15±0,1 | 14±0,2 |
| C60 | 20±0,1 | 17±0,2 | 20±0,3 | 0 | 0 | 0 |
| C63 | 26±0,2 | 15±0,1 | 21±0,1 | 20±0,3 | 19±0,3 | 18±0,3 |
| C65 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C67 | 18±0,2 | 15±0,2 | 17±0,4 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | |
|-----|--------|--------|----------|----------|----------|----------|
| C71 | 25±0,1 | 20±0,3 | 23±0,1 | 19±0,2 | 14±0,3 | 12±0,3 |
| C72 | 20±0,4 | 18±0,1 | 18±0,2 | 0 | 0 | 0 |
| C74 | 20±0,1 | 17±0,3 | 18±0,3 | 15±0,2 | 13±0,3 | 106с±0,4 |
| C77 | 0 | 0 | 146с±0,1 | 126с±0,1 | 106с±0,2 | 0 |

Примечание - бс-бактериостатическая активность

В отношении грамположительных бактерий проявили активность 85,7% изолятов актиномицетов. Изоляты С65 и С77 не обладали антагонизмом, а изолят С33 имел бактериостатическое действие. 66,7% изолятов обладали узким спектром действия, проявляя высокую активность против грамположительных бактерий. Больше половины (57,1%) изолятов не проявили антагонизма в отношении грамотрицательных тест-микроорганизмов, из них три изолята (С21, С41, С77) обладали бактериостатическим действием. Два изолята - С52 и С32 обладали широким спектром действия, проявив высокую активность как в отношении грамположительных так и в отношении грамотрицательных бактерий.

Выводы. Таким образом, поиск новых антибиотиков среди продуктов микробного метаболизма, себя не исчерпал, приобретает ещё большую актуальность и требует дальнейшего развития.

Источник финансирования исследований - Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РК в рамках программы «Отечественные гранты»

Список литературы

- 1 Беляева О.А., Кароль И.В., Крыжевский Е.Е., Балинская М.И. Причины антибиотикорезистентности, пути ее преодоления и рациональная антибиотикотерапия при перитоните //Новости медицины и фармации. - 2017. - № 5. - С. 14-18
- 2 Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance // Clin Microbiol Infect. - 2012. Vol.18.- № 3. - С. 268-281.
- 3 Выиграть время на разработку новых антибиотиков // Бюллетень Всемирной организации здравоохранения. - 2011. - № 2. - Вып. 89. - С. 88-89.
- 4 Ahn J.Y., Song J.E., Kim M.H. Risk factors for the acquisition of carbapenem-resistant Escherichia coli at a tertiary care center in South Korea: a matched case-control study // Am. J. Infect. Control. - 2014. -Vol. 42.- N. 6. - P. 621-625.
- 5 Kim T., Chong Y.P., Park S.Y. Risk factors for hospital-acquired

pneumonia caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria in critically ill patients: a multicenter study in Korea // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 78.- N. 4. – P. 457–461.

6 Bush K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections // *Crit Care.* – 2010. – Vol.14.- № 3. – P. 224-229.

7 Kaase M, Szabados F, Pfennigwerth N, Anders A, Geis G, Pranada AB, Roßler S, Lang U, Gatermann SG. Description of the metallo- β -lactamase GIM-1 in *Acinetobacter pittii* // *J Antimicrob Chemother.* – 2014. – Vol.69, № 1.- P. 81-84.

8 Звягинцев Д. Г., Зенова Г. М. Экология актиномицетов. М.: ГЕОС. – 2001.

9 Калакуцкий Л.В., Шарая Л.С., Актиномицеты и высшие растения // *Успехи микробиологии.* -1990. - №24.- С. 26-65.

10 Hughes C.C., Prieto-Davo A., Jensen P.R., Fenical W. The marinopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces* sp. // *Org Lett.* – 2008. – Vol.10, № 4. – P. 629-631.

11 Alshaibani, M.; Zin, N.; Jalil, J.; Sidik, N.; Ahmad, S.J.; Kamal, N.; Edrada-Ebel, R. Isolation, purification, and characterization of five active diketopiperazine derivatives from endophytic *Streptomyces* SUK 25 with antimicrobial and cytotoxic activities // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 27. – P. 1249–1256.

12 Теппер Е.З., Шильникова В.К. Практикум по микробиологии. Учебное пособие для ВУЗов. – М.: Дрофа, 2004. – 219 с.

13 Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. – М.: «Агропромиздат», 1990. – 283 с.

14 Бондарцев А.С. Шкала цветов. – М.: АН СССР, 1954. – 31 с.

15 Гаузе Н.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: «Наука». – 1983. – 245 с.

16 Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 528 с.