

Антибиотический потенциал морских актиномицетов родов *Streptomyces* и *Nocardioopsis*

*О. Н. СИНЁВА, В. С. САДЫКОВА, О. П. БЫЧКОВА,
Т. Д. ИВАНКОВА, К. В. МАЛЫШЕВА, Н. Н. МАРКЕЛОВА

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия

Antibiotic Potential of Marine Actinomycetes of the Genera *Streptomyces* and *Nocardioopsis*

*OLGA N. SINEVA, VERA S. SADYKOVA, OLGA P. BYCHKOVA,
TATIANA D. IVANKOVA, KSENIA V. MALYSHEVA, NATALIA N. MARKELOVA

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

Резюме

В связи с появлением антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов актуальным является поиск продуцентов новых антимикробных метаболитов. Актиномицеты — грамположительные мицелиальные бактерии, являющиеся продуцентами большого количества антибиотиков, применяемых в медицине и агропромышленном комплексе. В настоящее время внимание исследователей нацелено на поиск актиномицетов в таких экологических нишах, как пресные и морские водоёмы, зоны с экстремальными природными условиями (вечномёрзлые почвы, ледники, пустынные, засоленные почвы и др.). В данном исследовании были восстановлены культуры морских актиномицетов после 15 лет хранения под вазелиновым маслом. Показано, что все штаммы сохранили жизнеспособность и антибиотическую активность на высоком уровне. На основании анализа последовательностей гена 16S рРНК установлена видовая принадлежность данных штаммов: *Streptomyces sampsonii* 6N, *Streptomyces sampsonii* 8N, *Streptomyces sampsonii* 521N, *Streptomyces halstedii* 22N, *Streptomyces brevispora* 12N, *Streptomyces hirsutus* 23N, *Streptomyces niveus* 14N, *Nocardioopsis alba* 24N, *Nocardioopsis alba* 73N, *Nocardioopsis alba* 85N, *Nocardioopsis alba* 106N, *Nocardioopsis alborubida* 722N, *Nocardioopsis umidischolae* 755N, *Nocardioopsis umidischolae* 763N. Оценка антибиотической активности в отношении тест-организмов: *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA — Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pectobacterium carotovorum* VKM-B1247, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042, *Candida albicans* ATCC 14053, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* КПБ F-37, *Fusarium solani* ВКПМ F-890, *Fusarium oxysporum* ВКПМ F-148, показала, что данные актиномицеты обладают широким спектром антибиотической активности и могут быть потенциальными продуцентами новых антибиотиков.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность; актиномицеты; антибиотическая активность; *Streptomyces*; *Nocardioopsis*

Для цитирования: Синёва О. Н., Садыкова В. С., Бычкова О. П., Иванкова Т. Д., Малышева К. В., Маркелова Н. Н. Антибиотический потенциал морских актиномицетов родов *Streptomyces* и *Nocardioopsis*. Антибиотики и химиотерапия. 2023; 68: 3–4: 11–18. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-11-18>.

Abstract

Due to the emergence of antibiotic resistance in pathogenic microorganisms, it is urgent to search for producers of new antimicrobial metabolites. Actinomycetes are gram-positive mycelial bacteria that produce a large number of antibiotics used in medicine and the agro-industrial complex. Currently, researchers are focused on the search for actinomycetes in ecological niches such as freshwater and marine reservoirs, zones with extreme natural conditions (permafrost soils, glaciers, desert, saline soils, etc.). In this study, cultures of marine actinomycetes were restored after 15 years of storage under vaseline oil. It was shown that all strains retained viability and antibiotic activity at a high level. Based on the results of 16S rRNA gene sequence analysis, the species were identified as: *Streptomyces sampsonii* 6N, *Streptomyces sampsonii* 8N, *Streptomyces sampsonii* 521N, *Streptomyces halstedii* 22N, *Streptomyces brevispora* 12N, *Streptomyces hirsutus* 23N, *Streptomyces niveus* 14N, *Nocardioopsis alba* 24N, *Nocardioopsis alba* 73N, *Nocardioopsis alba* 85N, *Nocardioopsis alba* 106N, *Nocardioopsis alborubida* 722N, *Nocardioopsis umidischolae* 755N, *Nocardioopsis umidischolae* 763N. These strains of actinobacteria possessed significant antibiotic activity against the following pathogens: *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA — *Staphylococcus aureus*), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pectobacterium carotovorum* VKM-B1247, *Saccharomyces cerevisiae* INA 01042, *Candida al-*

bicans ATCC 14053, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* CPB F-37, *Fusarium solani* VKPM F-890, *Fusarium oxysporum* VKPM F-148. Therefore, this study evaluated the marine actinomycetes can be potential producers of the novel antibiotics.

Keywords: antibiotic resistance; actinomycetes; antibiotic activity; *Streptomyces*; *Nocardia*

For citation: Sineva O. N., Sadykova V. S., Bychkova O. P., Ivankova T. D., Malysheva K. V., Markelova N. N. Antibiotic potential of marine actinomycetes of the genera *Streptomyces* and *Nocardia*. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 11–18. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-11-18>.

Введение

Одной из серьёзных проблем здравоохранения является возникновение антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов к используемым антибиотикам. Бесконтрольное и необоснованное применение противомикробных препаратов, в том числе в агропромышленном комплексе, привело к возникновению штаммов патогенов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. В настоящее время в ряде стран разработаны меры, направленные на ограничение использования антибиотиков в животноводстве, главным образом, это касается антибиотиков, применяемых одновременно в медицине и животноводстве [1–5]. С другой стороны, в сельском хозяйстве остро стоит проблема потери урожайности культур из-за фитопатогенов — грибов рода *Fusarium* и грамотрицательных бактерий рода *Pectobacterium*. Поиск и разработка биопрепаратов против фитопатогенов связана с тем, что применяемые в настоящее время химические фунгициды наносят серьёзный ущерб окружающей среде [6–11]. Таким образом поиск новых антибиотиков является одной из актуальных проблем современности.

В настоящее время актиномицеты по-прежнему остаются лидерами по количеству синтезируемых антибиотиков. Большинство актиномицетов было выделено из различных типов почв, однако в настоящее время в связи с поиском продуцентов новых метаболитов, интересы исследователей направлены на изучение актиномицетов, обитающих в других экологических нишах, в том числе пресных и морских водоёмах, где актиномицеты также являются неотъемлемой частью микробиома [12–14].

Материал и методы

Объектами исследования служили восстановленные после 15 лет хранения под вазелиновым маслом 14 штаммов актиномицетов, выделенные из морских отложений Тронхеймс фьорда в Норвегии. Хранение осуществлялось при комнатной температуре в пробирках на плотных питательных средах Гаузе 2 (модификация (г/л): триптон — 3,0; пептон — 5,0; глюкоза — 10,0; NaCl — 5,0; агар — 20,0) и овсяном агаре (овсяная мука — 20,0; агар 20,0). Высев актиномицетов проводился на плотные питательные среды Гаузе 2 и овсяный агар, время культивирования составляло 7–10 дней в термостате при температуре 28°C.

Для определения влияния солей на рост актиномицетов использовали овсяный агар с добавлением NaCl в концентрациях 10, 20 и 30 г/л.

Определение антибиотической активности проводили стандартными методами — методом перпендикулярного штриха и методом лунок.

Глубинное культивирование актиномицетов для выявления антибиотической активности проводили в шейкере-инкубаторе ThermoStable IS-20 (DAIHAN Scientific, Республика Корея) при температуре 28°C и скорости 180 об/мин., на средах (состав компонентов указан в г/л):

- 1) 11654 (соевая мука — 20,0; глюкоза — 30,0; NaCl — 3,0; CaCO₃ — 3,0);
- 2) A4 (соевая мука — 10,0; глюкоза — 10,0; NaCl — 5,0; CaCO₃ — 2,5);
- 3) 6613 (крахмал — 20,0; кукурузный экстракт 6,0; KNO₃ — 4,0; NaCl — 5,0; CaCO₃ — 5,0);
- 4) Сахарозная (сахароза — 20,0; соевая мука — 10,0; KNO₃ — 2,0; NaCl — 3,0; CaCO₃ — 3,0);
- 5) 2663 (глицерин — 30,0; соевая мука — 15,0; NaCl — 2,0; CaCO₃ — 5,0);
- 6) 330 (крахмал — 8,5; гороховая мука — 15,0; сахароза — 21; NaNO₃ — 5,0; CaCO₃ — 5,0; NaCl — 5,0);
- 7) 5339 (глицерин — 20,0; соевая мука — 5,0; (NH₄)₂SO₄ — 1,5; NaCl — 3,0; CaCO₃ — 3,0).

Статистическую обработку данных (среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал) проводили в программе Excel 2016, доверительную вероятность принимали равной 0,95.

Антибиотическую активность определяли в отношении тест-организмов: *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA — Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pectobacterium carotovorum* VKM-B1247, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042, *Candida albicans* ATCC 14053, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* КПБ F-37, *Fusarium solani* VKPM F-890, *Fusarium oxysporum* VKPM F-148.

Выделение ДНК из образцов чистых культур актиномицетов осуществляли с использованием коммерческого набора DNeasy Power Soil Kit (Quagen, США), согласно прилагаемой методике. Идентифицировали изоляты на основании анализа последовательности ДНК гена 16S рРНК (рибосомной РНК), полученной амплификацией целевого участка ДНК. Амплифицируемый фрагмент ДНК общей протяжённостью до 1500 нуклеотидов включал девять вариативных регионов, разделённых консервативными участками. Фланкировали ген 16S рРНК универсальными прокариотическими праймерами: прямым — 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и обратным — 1492R 5'-GGTACCTGTACGACTT-3'. Реакцию ПЦР проводили с использованием готовой реакционной смеси БиоМастер HS-Taq ПЦР-Спец (2х) (Биолабмикс, Россия), предназначенной для ДНК-матриц со сложной пространственной структурой или с GC-богатыми участками, в термодиклере (BioRad, США). Условия амплификации: предденатурация — 95°C, 5 мин; денатурация — 95°C, 15 с; отжиг — 52°C, 20 с; элонгация — 72°C, 1 мин — 30 циклов; финальный синтез — 72°C, 7 мин. По окончании ПЦР-амплификации наличие целевых продуктов подтверждали методом электрофореза в

1,0% агарозном геле с бромистым этидием. Ампликоны из ПЦР-смеси очищали на колонках наборами Cleanup Standard (Евроген, Россия). Очищенные амплифицированные фрагменты ДНК использовали в реакции терминирующего секвенирования с применением флуоресцентно меченых дезоксирибонуклеотидтрифосфатов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, США) в соответствии с протоколом производителя. Дополнительно реакцию секвенирования проводили с прямым праймером 341F 5'-X-CCTAYGGGRBGCASCAG-3', отжиг которого приходится на участок V3 — один из вариабельных регионов гена 16S рРНК. Секвенирование методом Сэнгера проводили на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems™, США). Полученные электрофореграммы находились в диапазоне от 400 до 600 п.н. Редактирование нуклеотидных прочтений и сохранение данных секвенирования осуществляли в программе Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems, США). Сборку нуклеотидных последовательностей, прочитанных с трёх праймеров, и выравнивание их на референсные геномы (RefSeq: NCBI Reference Sequence Database) проводили при помощи программы SeqMan 7.1 (DNASTAR Inc.). Сохраняли информацию о собранных последовательностях в формате записи нуклеотидных последовательностей — FASTA и сравнивали полученные последовательности с уже существующими в базах данных NCBI [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi]. Данные в формате FASTA использовали для проведения филогенетического анализа методом PhyML Maximum Likelihood в программе UGENE.

Результаты и обсуждение

В настоящее время широко применяются методы хранения культур микроорганизмов, такие как низкотемпературное замораживание и криоконсервация, тем не менее метод хранения под минеральным маслом по-прежнему используется на практике, однако сведений в литературе об эффективности данного хранения для актиномицетов крайне мало [15–17]. Вероятно, это связано с тем, что результаты возможно оценить только качественно (наличие обильного роста, морфологию колоний, пигментацию), но, как известно, многие актиномицеты обладают антибиотической активностью и её оценка до и после хранения может служить важным критерием для обоснования пригодности данного метода хранения для исследуемых культур.

В данном исследовании до закладки на хранение под вазелиновым маслом была определена антибиотическая активность культур в отношении тест-организмов методом перпендикулярных штрихов, описаны культурально-морфологические признаки и родовая принадлежность. Оценку жизнеспособности проводили после второго пересева в связи с наличием капель вазелинового масла на чашках, мешающих росту колоний. Результаты высева 14 культур актиномицетов после 15 лет хранения показали, что все штаммы сохранили высокую жизнеспособность, т. е. обладали активным ростом на среде Гаузе 2 и овсяном агаре. Примеры роста представлены на рис. 1.

В исследовании была установлена видовая принадлежность культур актиномицетов на осно-

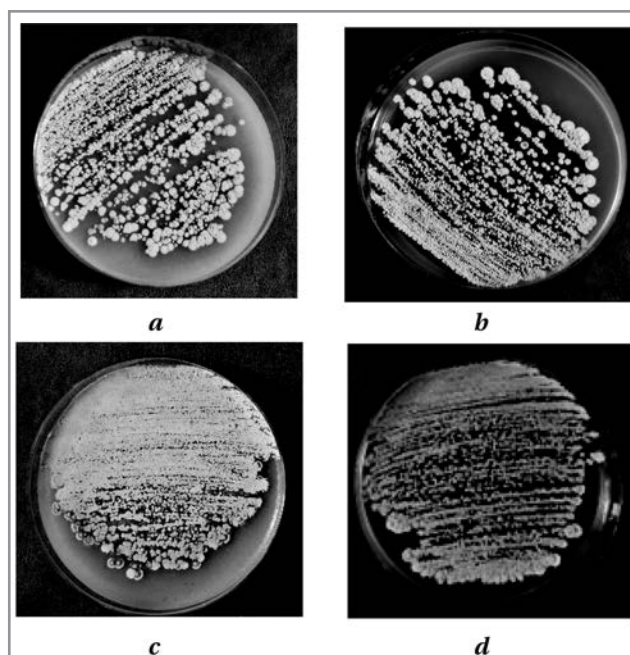


Рис. 1. Рост актиномицетов на плотных питательных средах после хранения под вазелиновым маслом: *Streptomyces sampsonii* 6N **a** — на овсяном агаре, **b** — на среде Гаузе 2; *Streptomyces halstedii* 22N: **c** — на овсяном агаре, **d** — на среде Гаузе 2.

Fig. 1. Growth of actinomycetes on dense nutrient media after storage under vaseline oil: *Streptomyces sampsonii* 6N **a** — on oat agar, **b** — on Gause 2 medium; *Streptomyces halstedii* 22N: **c** — on oat agar, **d** — on Gause 2 medium.

вания анализа последовательности ДНК гена 16S рРНК. Культуры актиномицетов были отнесены к следующим видам: *Streptomyces sampsonii* 6N, *Streptomyces sampsonii* 8N, *Streptomyces sampsonii* 521N, *Streptomyces halstedii* 22N, *Streptomyces brevispora* 12N, *Streptomyces hirsutus* 23N, *Streptomyces niveus* 14N, *Nocardioopsis alba* 24N, *Nocardioopsis alba* 73N, *Nocardioopsis alba* 85N, *Nocardioopsis alba* 106N, *Nocardioopsis alborubida* 722N, *Nocardioopsis umidischolae* 755N, *Nocardioopsis umidischolae* 763N, филогенетические деревья представлены на рис. 2, 3.

После восстановления роста культур актиномицетов была проведена оценка антибиотической активности методом перпендикулярных штрихов в отношении следующих тест-организмов: *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042, *Candida albicans* ATCC 14053 (табл. 1). Полученные результаты показали, что штаммы сохранили антибиотическую активность на высоком уровне, кроме *Nocardioopsis* sp. 722N, *Nocardioopsis* sp. 755N, *Nocardioopsis* sp. 763N, у которых до хранения была небольшая активность в отношении *Micrococcus luteus* ATCC 9341, а после восстановления её не

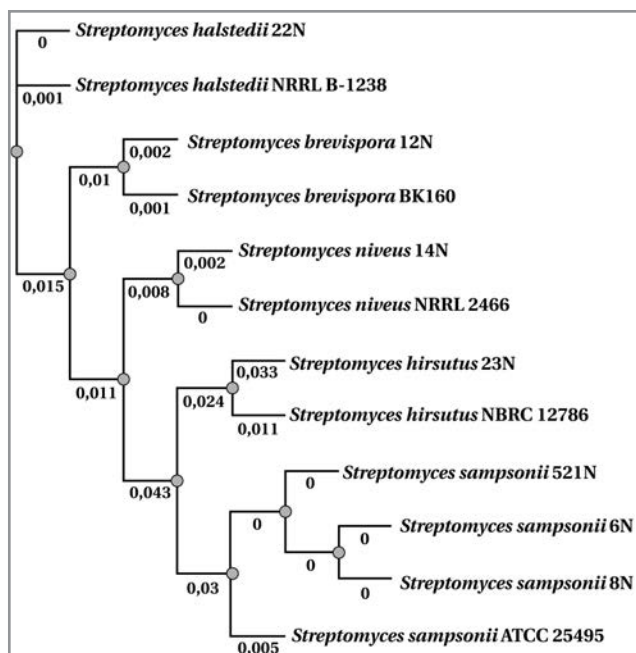


Рис. 2. Кладограмма выделенных актиномицетов рода *Streptomyces*, построенная на основе вероятных изменений в нуклеотидных последовательностях.
Fig. 2. A cladogram of isolated actinomycetes of the genus *Streptomyces* based on probable changes in nucleotide sequences.

удалось обнаружить данным методом.

Культивирование актиномицетов на жидких питательных средах показало, что штаммы *Streptomyces sampsonii* 6N, *Streptomyces sampsonii* 8N, *Streptomyces sampsonii* 521N, *Streptomyces halstedii* 22N, *Streptomyces hirsutus* 23N, *Nocardio*

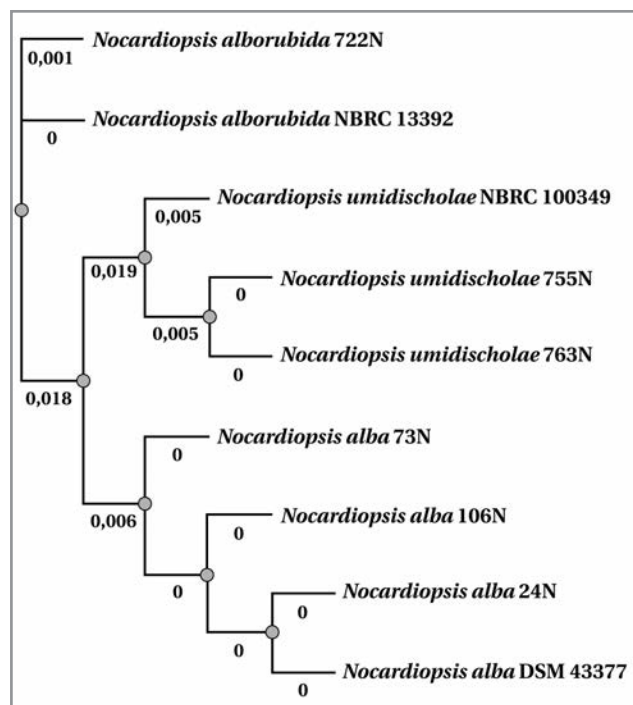


Рис. 3. Кладограмма выделенных актиномицетов рода *Nocardio*, построенная на основе вероятных изменений в нуклеотидных последовательностях.
Fig. 3. A cladogram of isolated actinomycetes of the genus *Nocardio* based on probable changes in nucleotide sequences.

discholae 763N обладают высокой антифунгальной активностью. В зависимости от состава среды, зоны подавления роста тест-организмов отличались, в табл. 2 представлены результаты с указанием питательных сред, при культивирова-

Таблица 1. Антибиотическая активность культур актиномицетов до закладки на хранение и после 15 лет хранения.
Table 1. Antibiotic activity of actinomycete cultures before and after 15 years of storage.

№ штаммов актиномицетов	Зоны подавления роста тест-организмов, мм															
	<i>S.aureus</i>		<i>S.aureus</i>		<i>M.luteus</i>		<i>B.subtilis</i>		<i>E.coli</i>		<i>Paerugi-</i>		<i>S.cerevisiae</i>		<i>C.albicans</i>	
	INA		INA 00761		ATCC		ATCC		ATCC		nosa ATCC		ИНА		ATCC	
	00985		(MRSA)		9341		6633		25922		27853		01042		14053	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>S.sampsonii</i> 6N	3	3	3	3	6	5	6	7	H/a	H/a	H/a	H/a	15	14	11	12
<i>S.sampsonii</i> 8N	5	4	5	4	4	5	7	7	H/a	H/a	H/a	H/a	22	20	12	12
<i>S.sampsonii</i> 521N	3	3	4	3	3	H/a	3	3	H/a	H/a	H/a	H/a	15	14	12	13
<i>S.halstedii</i> 22N	H/a	H/a	H/a	H/a	5	3	20	25	H/a	H/a	H/a	H/a	23	24	H/a	H/a
<i>S.brevispora</i> 12N	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	3	3	H/a	H/a	H/a	H/a	17	15	H/a	H/a
<i>S.hirsutus</i> 23N	H/a	H/a	H/a	H/a	5	3	4	3	20	23	H/a	H/a	4	4	H/a	H/a
<i>S.niveus</i> 14N	3	3	2	H/a	4	3	9	10	H/a	H/a	H/a	H/a	25	>30	H/a	H/a
<i>N.alba</i> 24N	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	25	>30	H/a	H/a
<i>N.alba</i> 73N	H/a	H/a	H/a	H/a	10	12	5	5	H/a	H/a	H/a	H/a	25	>30	H/a	H/a
<i>N.alba</i> 85N	H/a	H/a	H/a	H/a	14	15	5	5	H/a	H/a	H/a	H/a	25	>30	H/a	H/a
<i>N.alba</i> 106N	H/a	H/a	H/a	H/a	15	15	5	4	H/a	H/a	H/a	H/a	25	>30	H/a	H/a
<i>N.alborubida</i> 722N	H/a	H/a	H/a	H/a	2	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a
<i>N.umidischolae</i> 755N	H/a	H/a	H/a	H/a	3	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a
<i>N.umidischolae</i> 763N	H/a	H/a	H/a	H/a	2	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a

Примечание. Столбец 1 — до закладки на хранение; столбец 2 — после 15 лет хранения; H/a — нет активности.

Note. Column 1 — before the bookmark for storage; column 2 — after 15 years of storage; H/a — no activity.

Таблица 2. Антифунгальная активность актиномицетов при глубинном культивировании на разных средах.
Table 2. Antifungal activity of actinomycetes during deep cultivation on different media.

№ штамма	Среда	Зоны подавления роста тест-организмов, мм					
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ИНА 01042	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	<i>Fusarium oxysporum</i> ВКПМ F-148	<i>Fusarium solani</i> ВКПМ F-890	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Aspergillus fumigatus</i> КПБ F-3
<i>S.sampsonii</i> 6N	Гаузе 2	25,5±0,3	20,5±0,3	25,5±0,3	30,1±0,4	16,8±0,4	14,1±0,5
	A4	25,3±0,4	20,3±0,5	29,8±0,5	34,8±0,5	15±0,5	12±0,4
<i>S.sampsonii</i> 8N	Гаузе 2	35,1±0,5	19,4±0,5	34,8±0,5	40,6±0,4	16±0,5	12±0,4
	A4	29,8±0,5	18±0,4	40,6±0,4	15,2±0,4	18±0,4	12±0,4
<i>S.sampsonii</i> 521N	Гаузе 2	30,1±0,4	20,5±0,3	35,1±0,5	28,5±0,4	18±0,4	15±0,5
	A4	25,5±0,3	28,5±0,4	29,8±0,5	29,8±0,5	20,5±0,3	15,7±0,4
	6613	25,3±0,4	24±0,3	30,1±0,4	24±0,3	24±0,3	14,1±0,5
<i>N.alba</i> 106N	6613	25,3±0,4	30,1±0,4	18±0,4	12,5±0,3	20,5±0,3	12±0,4
	5339	25,5±0,3	30,7±0,3	20,6±0,4	15±0,8	14,3±0,4	14,3±0,4
<i>N.alba</i> 24N	11654	15±0,8	14,3±0,4	24±0,3	14,5±0,5	18±0,4	11,5±0,3
	5339	14,3±0,4	14,5±0,5	15±0,8	15,7±0,4	16±0,5	11,3±0,3
<i>S.halstedii</i> 22N	Гаузе 2	20,4±0,3	14,3±0,4	20,4±0,3	20,4±0,3	11,5±0,3	11,3±0,3
	A4	20,4±0,3	15±0,5	14,5±0,5	15±0,5	12,5±0,3	11,5±0,3
<i>S.hirsutus</i> 23N	11654	12,5±0,3	12,5±0,3	15±0,5	14,5±0,5	H/a	H/a
	A4	13±0,4	12,5±0,3	15,2±0,4	15±0,5	H/a	H/a
<i>N.umidischolae</i> 763N	A4	13±0,4	н/а	20,4±0,3	20,4±0,3	H/a	H/a

Примечание. Здесь и в табл. 3: H/a — нет активности.

Note. Here and Table 3: H/a — no activity.

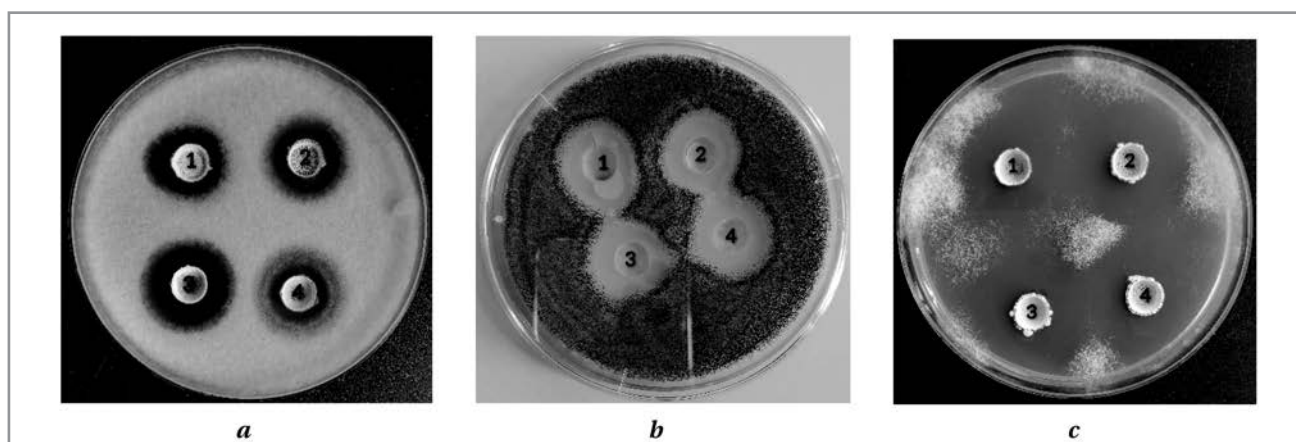


Рис. 4. Антифунгальная активность актиномицетов при глубинном культивировании на средах разного состава.
a — тест-культура *Fusarium solani* ВКПМ F-890, среда культивирования A4, штаммы: 1 — *S.hirsutus* 23N; 2 — *N.alba* 106N; 3 — *N.umidischolae* 763N; 4 — *S.halstedii* 22N.

b — тест-культура *Aspergillus niger* ATCC 16404, среда культивирования 11654, штаммы: 1 — *S.sampsonii* 6N; 2 — *N.alba* 24N; 3 — *S.sampsonii* 8N; 4 — *S.sampsonii* 571N.

c — тест-культура *Fusarium oxysporum* ВКПМ F-148, среда культивирования 5339, штаммы: 1 — *N.alba* 24N; 2 — *S.sampsonii* 6N; 3 — *S.sampsonii* 571N; 4 — *S.sampsonii* 8N.

Fig. 4. Antifungal activity of actinomycetes during deep cultivation on media of different composition.

a — test culture *Fusarium solani* VKPM F-890, cultivation medium A4, strains: 1 — *S.hirsutus* 23N; 2 — *N.alba* 106N; 3 — *N.umidischolae* 763N; 4 — *S.halstedii* 22N.

b — test culture *Aspergillus niger* ATCC 16404, cultivation medium 11654, strains: 1 — *S.sampsonii* 6N; 2 — *N.alba* 24N; 3 — *S.sampsonii* 8N; 4 — *S.sampsonii* 571N.

c — test culture of *Fusarium oxysporum* VKPM F-148, culture medium 5339, strains: 1 — *N.alba* 24N; 2 — *S.sampsonii* 6N; 3 — *S.sampsonii* 571N; 4 — *S.sampsonii* 8N.

нии на которых актиномицеты проявляли наибольшую антифунгальную активность, на рис. 4 показаны зоны ингибирования роста *Aspergillus niger* ATCC 16404 и фитопатогенных грибов *Fusarium solani* ВКПМ F-890, *Fusarium oxysporum*

ВКПМ F-148 при культивировании актиномицетов на различных питательных средах.

Ранее исследователями была показана антифунгальная активность для вида *S.sampsonii*, выделенного из агролесомелиоративной почвы,

Таблица 3. Антибиотическая активность актиномицетов в отношении грамположительных тест-организмов при глубинном культивировании.

Table 3. Antibiotic activity of actinomycetes against gram-positive test organisms during deep cultivation.

№ штамма	Среда	Зоны подавления роста тест-организмов, мм			
		<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00985	<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA)	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
<i>S.sampsonii</i> 6N	A4	10,2±0,3	H/a	12,1±0,4	14,1±0,4
<i>S.sampsonii</i> 8N	11654	10,3±0,3	H/a	13,8±0,3	15±0,4
	A4	10,3±0,3	H/a	13±0,4	15,2±0,4
<i>S.sampsonii</i> 521N	Гаузе 2	H/a	H/a	22,1±0,4	12,1±0,4
<i>S.brevispora</i> 12N	сахарозная	13,7±0,3	14±0,4	14,1±0,4	14,1±0,4
<i>S.halstedii</i> 22N	Гаузе 2	12,1±0,4	н/а	16,1±0,4	18,2±0,3
	сахарозная	12,3±0,3	12,3±0,3	14,1±0,4	15,2±0,4
<i>N.alba</i> 24N	11654	17,2±0,3	H/a	15±0,4	15±0,4
<i>N.alba</i> 73N	Гаузе 2	H/a	H/a	14,3±0,3	13,5±0,3
<i>N.alba</i> 85N	Гаузе 2	H/a	H/a	14±0,4	14±0,4
<i>N.alba</i> 106N	6613	25,1±0,4	H/a	20,4±0,4	18,2±0,3

в отношении фитопатогенных грибов — *Foxysporum*, *Sclerotinium rolfii*, и *Rizhooctonia solani* за счёт образования антибиотиков группы полиенов [18]. Для штамма *S.sampsonii* (MN700191 «DG1») проявление антифунгального эффекта в отношении фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* было обусловлено наличием ароматических соединений (фенола, аценафтена, 1,4-бензолдиола и производных фталата) в культуральной жидкости [19].

В отношении грамположительных бактерий *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA) выделенные культуры не обладали высокой антибиотической активностью, наилучшие результаты представлены в табл. 3. Было отмечено появление зон ингибирования роста *Micrococcus luteus* ATCC 9341 диаметром 11–12 мм у штаммов *Nocardioptis alborubida* 722N, *Nocardioptis umidischolae* 755N, *Nocardioptis umidischolae* 763N, которые не удалось обнаружить методом штрихов, сделанным сразу после восстановления штаммов, таким образом, можно сделать вывод, что данные культуры не утратили антибиотическую активность после хранения, но им требовалось больше времени для восстановления. Антибактериальная активность в отношении грамположительных тест-бактерий *Micrococcus luteus* ATCC 14452 ранее была показана для галотолерантного штамма вида *N.alba* [20].

Небольшие зоны ингибирования роста (15–16 мм) грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 выявлены у штаммов актиномицетов *N.alba* 24N, *N.alba* 106N, *S.hirsutus* 23N при культивировании на средах 11654, 6613, Гаузе 2, соответственно. В отношении фитопатогенной бактерии *Pectobacterium carotovorum* VKM-B1247 бактериостатическую активность (диаметр зоны

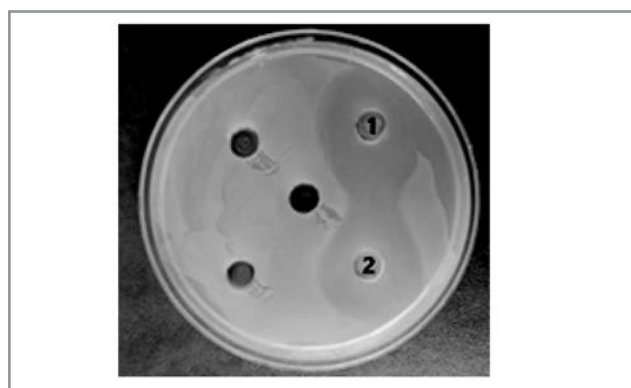


Рис. 5. Зоны подавления *Pectobacterium carotovorum* KM-B1247 культурами актиномицетов.

1 — *Nocardioptis alba* 24N; 2 — *Streptomyces hirsutus* 23N при культивировании на среде Гаузе 2.

Fig. 5. Suppression zones of *Pectobacterium carotovorum* VKM-B1247 by actinomycete cultures.

1 — *Nocardioptis alba* 24N; 2 — *Streptomyces hirsutus* 23N when cultured on Gause medium 2.

подавления роста — 25–30 мм) проявляли культуры *N.alba* 24N и *S.hirsutus* 23N (рис. 5).

Изучение роста актиномицетов на овсяном агаре с содержанием NaCl в концентрациях 10, 20, 30 г/л показало, что все штаммы обладали активным ростом при всех указанных вариантах концентраций солей (рис. 6).

Заключение

Проведённое исследование показало, что культуры морских актиномицетов родов *Streptomyces* и *Nocardioptis* полностью сохранили жизнеспособность и антибиотическую активность после 15 лет хранения под вазелиновым маслом. Таким образом, данный метод может быть рекомендован для длительного хранения культур актиномицетов.

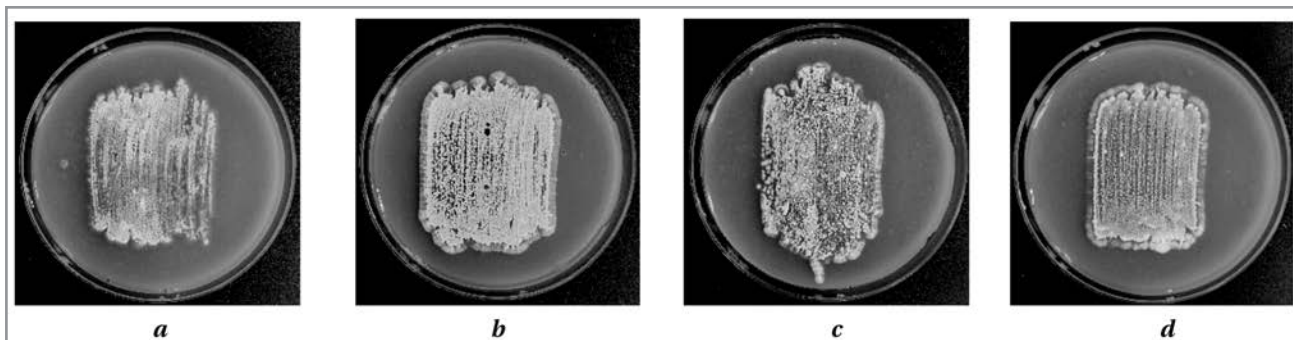


Рис. 6. Рост *Nocardioopsis alba* 73N на овсяном агаре при разных концентрациях солей.

a — контроль; *b* — 10 г/л NaCl; *c* — 20 г/л NaCl; *d* — 30 г/л NaCl.

Fig. 6. Growth of *Nocardioopsis alba* 73N on oat agar at different salt concentrations.

a — control; *b* — 10 g/l NaCl; *c* — 20 g/l NaCl; *d* — 30 g/l NaCl.

Установлено, что выделенные штаммы являются галотолерантными и обладают широким спектром антибиотической активности, в том числе в отношении фитопатогенов, и целесообразным является их дальнейшее изучение в качестве продуцентов новых антибиотиков.

Литература/References

- Berdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)*. 2012; 65 (8): 385–395. doi: 10.1038/ja.2012.27.
- Ventola C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*. 2015; 40 (4): 277–283.
- Орлова Н.В. Антибиотикорезистентность и современная стратегия антибактериальной терапии. *Медицинский совет*. 2022; 16 (8): 89–97. doi: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-8-89-97>. [Orlova N.V. Antibiotikorezistentnost' i sovremennaya strategiya antibakterial'noi terapii. *Meditsinskii Sovet*. 2022; 16 (8): 89–97. doi: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-8-89-97>. (in Russian)]
- Мурленков Н.В. Проблемы и факторы развития антибиотикорезистентности в сельском хозяйстве. *Биология в сельском хозяйстве*. 2019; 4: 11–14. [Murlenkov N.V. Problemy i faktory razvitiya antibiotikorezistentnosti v sel'skom khozyaistve. *Biologiya v Sel'skom Khozyaistve*. 2019; 4: 11–14. (in Russian)]
- Sarkar D. J., Mukherjee I., Shakil N.A., Rana V.S., Kaushik P., Debnath S. Antibiotics in Agriculture: Use and Impact. *Indian Journal of Ethnopharmacology*. 2018; 4 (1): 4–19.
- Munkvold G. Fusarium species and their associated mycotoxins. *Methods Mol Biol*. 2017; 1542: 51–106. doi: 10.1007/978-1-4939-6707-0_4.
- Meng X., Chai A., Shi Y., Xie X., Ma Z., Li B. Emergence of bacterial soft rot in cucumber caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in China. *Plant Dis*. 2017; 101 (2): 279–287. doi: 10.1094/PDIS-05-16-0763-RE.
- Waleron M., Misztak A., Waleron M., Franczuk M., Wielgomas B., Waleron K. Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains isolated from potatoes grown at high altitudes to *Pectobacterium peruviansense* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*. 2018; 41 (2): 85–93. doi: 10.1016/j.syapm.2017.11.005.
- Широких И.Г., Назарова Я.И., Бакулина А.В., Абубакирова Р.И. Новые штаммы стрептомицетов как перспективные биофунгициды. *Теоретическая и прикладная экология*. 2021; 1: 172–180. doi: <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-1-172-180>. [Shirokikh I.G., Nazarova Ya.I., Bakulina A.V., Abubakirova R.I. Novye shtammy streptomisetov kak perspektivnye biofungitsidy. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2021; 1: 172–180. doi: <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-1-172-180>. (in Russian)]
- Ulloa-Ogaza A.L., Munoz-Castellanos L.N., Nevarez-Moorillon G.V. Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as mechanism of control. In book: *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs*. 2015: 305–309.
- Pasanen M., Laurila J., Brader G., Palva E.T., Ahola V., van der Wolf J., A. Hannukkala A., Pirhonen M. Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolates from diseased potato plants in Finland. *Annals of Applied Biology* I. 2016; 163 (3): 403–419. doi: <https://doi.org/10.1111/aab.12076>
- Selim M. S. M., Abdelhamid S. A., Mohamed S. S. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *J Gen Eng Biotechnol*. 2021; 19 (1): 1–13. doi: 10.1186/s43141-021-00156-9.
- Орлова Т.И., Булгакова В. Г., Полин А. Н. Вторичные метаболиты морских микроорганизмов. I Вторичные метаболиты морских актиномицетов. *Антибиотики и химиотер*. 2015; 60 (7–8): 47–59. [Orlova T.I., Bulgakova V.G., Polin A.N. Secondary metabolites from marine microorganisms. I. Secondary metabolites from marine actinomycetes. *Antibiotici i Khimioter*. 2015; 60 (7–8): 47–59 (in Russian)]
- Elnahas M.O., Elkhateeb W.A., Daba G.M. Marine actinomycetes the past, the present and the future. *Open Access Journal of Pharmaceutical Research*. 2021; 5 (2): 1–7. doi: 10.23880/oajpr-16000241
- Синёва О.Н., Иванкова Т.Д., Терехова Л.П. Низкотемпературное хранение актиномицетов — представителей рода *Streptomyces*. *Антибиотики и химиотер*. 2019; 64 (3–4): 3–8. doi: <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-10011>. [Sineva O.N., Ivankova T.D., Terekhova L. P. Low temperature storage of actinomycetes — members of genus *Streptomyces*. *Antibiotici i Khimioter*. 2019; 64 (3–4): 3–8. doi: <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-10011>. (in Russian)]
- Выборнова Т.В., Шарова Н. Ю., Принцева А. А. Возможности криоконсервирования коллекционных штаммов актиномицетов *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* — продуцентов ингибиторов гликозидаз. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019; 9 (4): 643–653. doi: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-643-653>. [Vybornova T.V., Sharova N.Yu., Printseva A.A. Cryopreservation potential of *Streptomyces lucensis* and *Streptomyces violaceus* actinomycete collection strains as producers of glycosidase inhibitors. *Proceedings of universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019; 9 (4): 643–653. doi: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-643-653>. (in Russian)]
- Бекмухамедова Н. К., Мавжудова А. М., Куканова С. И., Зайнитдинова Л. И., Мамиев М. С. Сохранность антагонистических свойств актиномицетов при хранении различными методами. *Universum: химия и биология: электронный научный журнал*. 2021; 2 (80). URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/11236> (дата обращения: 05.02.2021). [Bekmukhamedova N.K., Mavzhudova A.M., Kukanova S.I., Zainitdinova L.I., Mamiev M.S. Preservation of the antagonistic properties of actinomycetes when stored by various methods. *Universum: khimiya i biologiya: elektronnyj nauchnyj zhurnal*. 2021; 2 (80). URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/11236> (data obrashcheniya: 05.02.2021). (in Russian)]
- Radhakrishnan S., Varadharajan M. Isolation, identification, and screening of polyene antifungal compound producing *Streptomyces sampsonii* MDCE7 from agroforestry soil. In Dharumadurai D. editor. *Methods in*

actinobacteriology. Springer protocols handbooks. 2022; 379–389. doi: 10.1007/978-1-0716-1728-1_46).

19. *Ghanem G.A.M., Gebily D.A.S., Ragab M.M. et al.* Efficacy of antifungal substances of three *Streptomyces* spp. against different plant pathogenic fungi. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 2022; 32: 112 doi: 10.1186/s41938-022-00612-9.

20. *Sarmiento-Vizcaino A., Martín J., Reyes F., García L.A., Blanco G.* Bioactive natural products in *Actinobacteria* isolated in rainwater from storm clouds transported by western winds in Spain. Front Microbiol. 2021; 12: 773095. doi: 10.3389/fmicb.2021.773095.

Информация об авторах

Синёва Ольга Николаевна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-0063-4922

Садыкова Вера Сергеевна — д. б. н., заведующая лабораторией таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-9372-5948

Бычкова Ольга Петровна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории разработки методов поиска биологически активных соединений Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-4107-3794

Иванкова Татьяна Дмитриевна — научный сотрудник лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. Scopus Author ID: 56069625600

Мальшиева Ксения Владимировна — лаборант лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия

Маркелова Наталья Николаевна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории биосинтеза антибиотиков Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-0759-721X

About the authors

Olga N. Sineva — Ph. D. in Biology, Researcher at the Department of Taxonomic Research and Culture Collection of Microorganisms, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-0063-4922

Vera S. Sadykova — D. Sc. in Biology, Head of at the Department of Taxonomic Research and Culture Collection of Microorganisms Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-9372-5948

Olga P. Bychkova — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Department for the Development of Methods for Discovering Biologically Active Compounds, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-4107-3794

Tatiana D. Ivankova — Researcher at the Department of Taxonomic Research and Culture Collection of Microorganisms, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. Scopus Author ID: 56069625600

Ksenia V. Malysheva — Laboratory assistant at the Department of Taxonomic Research and Culture Collection of Microorganisms, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

Natalia N. Markelova — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Laboratory biosynthesis of antibiotic, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-0759-721X