

Подход к поиску продуцентов антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость микроорганизмов

М. В. ДЕМЬЯНKOVA^{1,2}, В. С. САДЫKOVA¹, А. А. ГЛУХОВА¹, Т. А. ЕФИМЕНКО¹,
Ю. В. БОЙKOVA¹, Н. Д. МАЛКИНА¹, В. Г. КОРМИЛИЦИНА², С. О. ШАРАПЧЕНКО²,
И. Г. СУМАРУKOVA¹, Б. Ф. ВАСИЛЬЕВА¹, Т. Д. ИВАНKOVA¹, Л. П. ТЕРЕХОВА¹,
Н. И. ГАБРИЭЛЯН², *О. В. ЕФРЕМЕНKOVA¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Российская Федерация

² ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Approach to Searching for the Producers of Antibiotics That Overcome Drug Resistance of Microorganisms

MARIYA V. DEMIANKOVA^{1,2}, VERA S. SADYKOVA¹, ALLA A. GLUKHOVA¹,
TATIANA A. EFIMENKO¹, YULIYA V. BOYKOVA¹, NATALIA D. MALKINA¹,
VICTORIA G. KORMILITSINA², SOFYA O. SHARAPCHENKO², IRINA G. SUMARUKOVA¹,
BYAZILYA F. VASILIEVA¹, TATIANA D. IVANKOVA¹, LARISSA P. TEREKHOVA¹,
NINA I. GABRIELYAN², OLGA V. EFREMENKOVA^{1*}

¹ Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

² Academician V. I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

Резюме

В настоящее время проблема устойчивости к антибиотикам оппортунистических и патогенных микроорганизмов является чрезвычайно актуальной. Чтобы найти новые эффективные природные антибиотики, необходимо активизировать процесс поиска. При поэтапном отборе наиболее перспективных продуцентов нами была введена стадия определения антибиотической активности культуральной жидкости исследуемых природных штаммов в отношении клинических изолятов госпитальных микроорганизмов с множественной устойчивостью к антибиотикам медицинского назначения. Определение видовой принадлежности потенциальных продуцентов позволяет выбрать тех продуцентов конкретного вида, которые отличаются по антимикробному спектру активности от описанных в литературе. Были отобраны четыре штамма актиномицетов, которые проявляли активность в отношении устойчивых клинических изолятов дрожжей *Candida albicans*, *C. famata*, *C. arapsilosis* и *Cryptococcus neoformans*, а именно: *Nocardia soli* ИНА 01217, *Streptomyces bottropensis* ИНА 01214, *S. chromofuscus* ИНА 01211 и *S. netropsis* ИНА 01190. Штамм *N. soli* ИНА 01217 также проявляет антибиотическую активность против грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922. Эти штаммы продуцентов актиномицетов были отобраны для последующих химических исследований образованных ими противомикробных соединений.

Ключевые слова: устойчивость к антибиотикам; поиск антибиотиков; противогрибковые; актиномицеты

Для цитирования: Демьянкова М. В., Садыкова В. С., Глухова А. А., Ефименко Т. А., Бойкова Ю. В., Малкина Н. Д., Кормилицина В. Г., Шарапченко С. О., Сумарукова И. Г., Васильева Б. Ф., Иванкова Т. Д., Терехова Л. П., Габриелян Н. И., Ефременкова О. В. Подход к поиску продуцентов антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость микроорганизмов. *Антибиотики и химиотерапия*. 2021; 66: 7–8: 4–12. doi: 10.24411/0235-2990-2021-66-7-8-4-12.

Abstract

Currently, the problem of antibiotic resistance of opportunistic and pathogenic microorganisms is extremely urgent. In order to find new effective natural antibiotics, it is necessary to intensify the search process. In the gradual selection of the most promising producers, we introduced the stage of determining the antibiotic activity of the culture fluid of the studied natural strains against the clinical isolates of hospital microorganisms with multiple resistance to medical antibiotics. Determining the species affiliation of potential producers allows to select those producers of a particular species that differ in the antimicrobial spectrum of activity from those described in the literature. Four strains of actinomycetes that showed

© Коллектив авторов, 2021

*Адрес для корреспонденции: Большая Пироговская улица, 11, стр. 1, НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, г. Москва, Российская Федерация, 119021.
E-mail: mary_bunny@mail.ru

© Team of Authors, 2021

*Correspondence to: 11/1 Bolshaya Pirogovskaya st., Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russian Federation.
E-mail: mary_bunny@mail.ru

activity against resistant clinical isolates of yeast *Candida albicans*, *C. famata*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans* were selected, namely: *Nocardia soli* INA 01217, *Streptomyces bottropensis* INA 01214, *S. chromofuscus* INA 01211 and *S. neotropis* INA 01190. The *N. soli* INA 01217 strain also shows antibiotic activity against the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* ATCC 25922. These strains of actinobacterial producers were selected for subsequent chemical studies of the antimicrobial compounds formed by them.

Keywords: antibiotic resistance; searching for antibiotics; antimycotics; actinobacteria

For citation: Demiankova M. V., Sadykova V. S., Glukhova A. A., Efimenko T. A., Boykova Y. V., Malkina N. D., Kormilitsina V. G., Sharapchenko S. O., Sumarukova I. G., Vasilieva B. F., Ivankova T. D., Terekhova L. P., Gabrielyan N. I., Efremenkova O. V. Approach to searching for the producers of antibiotics that overcome drug resistance of microorganisms. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2021; 66: 7–8: 4–12. doi: 10.24411/0235-2990-2021-66-7-8-4-12.

Применение антибиотиков в медицине началось в 1940-х, но одновременно стали выявляться микроорганизмы, устойчивые к антибиотикам. С годами проблема устойчивости (резистентности) усугублялась и в настоящее время стала угрожающей. По прогнозам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), к 2050 г. мировая смертность от инфекционных заболеваний, не поддающихся антибактериальной терапии, составит 10 млн человек в год и выйдет на одно из первых мест наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями [1, 2].

Решение проблемы антибиотикорезистентности должно быть комплексным, включающим контроль за применением антибиотиков (в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности), разработку новых схем лечения и профилактики инфекционных заболеваний, создание пула резервных антибиотиков. Задача поиска новых эффективных природных антибиотиков весьма актуальна.

Примерно из 30 000 природных антибиотиков только 200–220 используются в медицине, но их эффективность вследствие распространения резистентных форм условно-патогенных и патогенных микроорганизмов неуклонно снижается. Актиномицеты производят около трети известных антибиотиков. Эта группа бактерий была хорошо изучена в 1950–1970 гг., но в настоящее время количество выявленных продуцентов новых антибиотиков у актиномицетов меньше, однако потенциал актиномицетов ещё не исчерпан. В частности, в период с 2000 по 2017 гг. в медицинскую практику были введены только два новых природных антибиотика — даптомицин и фидаксомицин, которые оба продуцируются актиномицетами [3, 4].

Традиционно процесс разработки новых природных антибиотиков состоит из нескольких этапов: выделение штаммов предполагаемых продуцентов из природной среды, разработка условий культивирования, определение спектра антимикробной активности, идентификация видов продуцентов, выделение и химическая идентификация продуцируемых веществ, доклинические и клинические исследования. В данной работе описан подход к поиску продуцентов при-

родных антимикробных соединений, включающий определение активности в отношении резистентных форм клинических изолятов до выделения, очистки и химических исследований. Цель такого подхода — отбор наиболее перспективных продуцентов для химического изучения с целью повышения вероятности выявления продуцентов новых антибиотиков, преодолевающих устойчивость условно-патогенных и патогенных микроорганизмов к современным медицинским антибиотикам. Объектами исследования являются актиномицеты, и основная задача заключается в выявлении продуцентов антимикотиков, активных в отношении резистентных штаммов условно-патогенных дрожжей.

Материал и методы

Объекты исследования. Актиномицеты выделены из почв Московской и Рязанской областей, а также Краснодарского края. Штаммы депонированы в Коллекции культур ФГБНУ «НИИНА им. Г. Ф. Гаузе (акроним коллекции ИНА).

Культуральные среды. Агаровые среды для роста и идентификации актиномицетов, а также жидкие культуральные среды, разработаны для продуцентов антибиотиков в ФГБНУ «НИИНА» им. Г. Ф. Гаузе [5].

Условия культивирования. Для хранения и поддержания всех микроорганизмов использовали среду №2 Гаузе. Актиномицеты инкубировали при 28°C в течение 10–12 сут. Другие бактериальные тест-штаммы инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C; исключение составлял штамм *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ-4177, который инкубировали при 28°C. Грибные тест-штаммы *Aspergillus niger* ИНА 00760 и *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01129 инкубировали при 28°C в течение 48 и 24 ч, соответственно.

Погружённое культивирование актиномицетов проводили в две стадии на роторных качалках со скоростью вращения 200 об/мин. Использовали колбы Эрленмейера объёмом 750 мл со 150 мл культуральной среды. На первой стадии использовали жидкую среду № 2 Гаузе, которую засеивали кусочком агаровой среды размером примерно 1 см² с поверхностным ростом актиномицета. После 4 сут культивирования для второй стадии полученную культуральную жидкость в количестве 5 мл вносили в колбы со свежей средой. Отбор проб для определения антибиотической активности проводили на четвёртый и седьмой день роста.

Определение антимикробной активности. Коллекционные штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов, а также клинические изоляты микроорганизмов с различной устойчивостью к антибиотикам, использовали для определения антимикробной активности. Идентификацию клинических изолятов и их чувствительность к антибиотикам проводили на автоматизированном бактериологическом анализаторе Siemens MicroScan Walk Away —

Таблица 1. Видовая идентификация актиномицетов на основании анализа гена 16S рРНК
Table 1. Species identification of actinomycetes based on the analysis of 16S rRNA genes

Вид, штамм	ДНК, по	Процент совпадения	Номер депонирования в базе данных GenBank
<i>Streptomyces antibioticus</i> ИНА 01148	1357	99,1	—
<i>S. netropsis</i> ИНА 01190	1356	100	МК496650
<i>S. chromofuscus</i> ИНА 01211	1340	97,1	МК496648
<i>S. hydrogenans</i> ИНА 01212	1357	100	МК238399
<i>S. bottropensis</i> ИНА 01214	1374	99,5	МК496651
<i>S. hydrogenans</i> ИНА 01215	1366	99,3	МК496652
<i>Nocardia soli</i> ИНА 01217	1355	99,4	МК496654
<i>S. lusitanus</i> ИНА 01218	1366	95,6	МК496655
<i>S. peucetius</i> ИНА 01255	1360	99	—
<i>S. chartreusis</i> ИНА 01259	1363	100	—

96 Plus System. Антимикотическую чувствительность дрожжевых клинических изолятов проводили с использованием тест-системы FUNGITEST™ (BIO-RAD, Франция). Антибиотическую активность актиномицетов в культуральной жидкости определяли методом диффузии в агар. Для этого по 100 мкл аликвот культуральной жидкости вносили в лунки диаметром 9 мм в агаризованной среде, инокулированной тестируемыми штаммами. После инкубирования в течение 20–24 ч измеряли диаметры зон задержки роста тест-штаммов как показатель антибиотического действия.

Видовая идентификация актиномицетов. Для видовой идентификации оценивали строение спораносцев, поверхность спор, пигментацию воздушного и субстратного мицелия, а также пигмент, выделяющийся в среду. Для микроскопирования использовали световой микроскоп Микмед-6 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия). Споры актиномицетов исследовали на сканирующем электронном микроскопе JEOL-6060A (JEOL, Токио, Япония) с вольфрамовым катодом. Платину распыляли на образцы, напыляли в установке в установке JFC-1600 (JEOL, Япония). Последовательность гена 16S рРНК также учитывали для идентификации видов. Для выделения ДНК использовали трёхсуточную культуральную жидкость. Выделение геномной ДНК из биомассы актиномицетов осуществляли с использованием набора DNeasy PowerSoil (Qiagen, Hilden, Германия). ПЦР гена 16S рРНК проводили с использованием набора реагентов PCR Master Mix (содержит ДНК-полимеразу Taq; Thermo Scientific, Калифорния, США) и универсальных бактериальных праймеров 27f (aga gtt tga tcc tgg ctacg) и 1492r (tac ggy tac ctt gtt acg act t). ПЦР проводили в Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США) по программе: (1) 94°C в течение 5 мин, (2) 30 циклов с чередующимися температурными интервалами — 94°C в течение 1 мин, 51°C в течение 1 мин, 72°C в течение 2 мин, (3) 72°C в течение 7 мин. Анализ продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1% агарозном геле (с использованием TBE трис-боратного буфера) при напряжённости электрического поля 7,6 В/см. Очистку продуктов ПЦР осуществляли переосаждением ДНК в мягких условиях с использованием 0,125 М ацетата аммония в 70% этаноле. Нуклеотидные последовательности определяли методом Сэнгера в генном анализаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, Массачусетс, США). Программу Mega 7 использовали для сборки нуклеотидных последовательностей. Полученные последовательности сравнивали с нуклеотидными последовательностями гена 16S рРНК штаммов актинобактерий из баз данных GenBank (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) и Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu/>).

Результаты и обсуждение

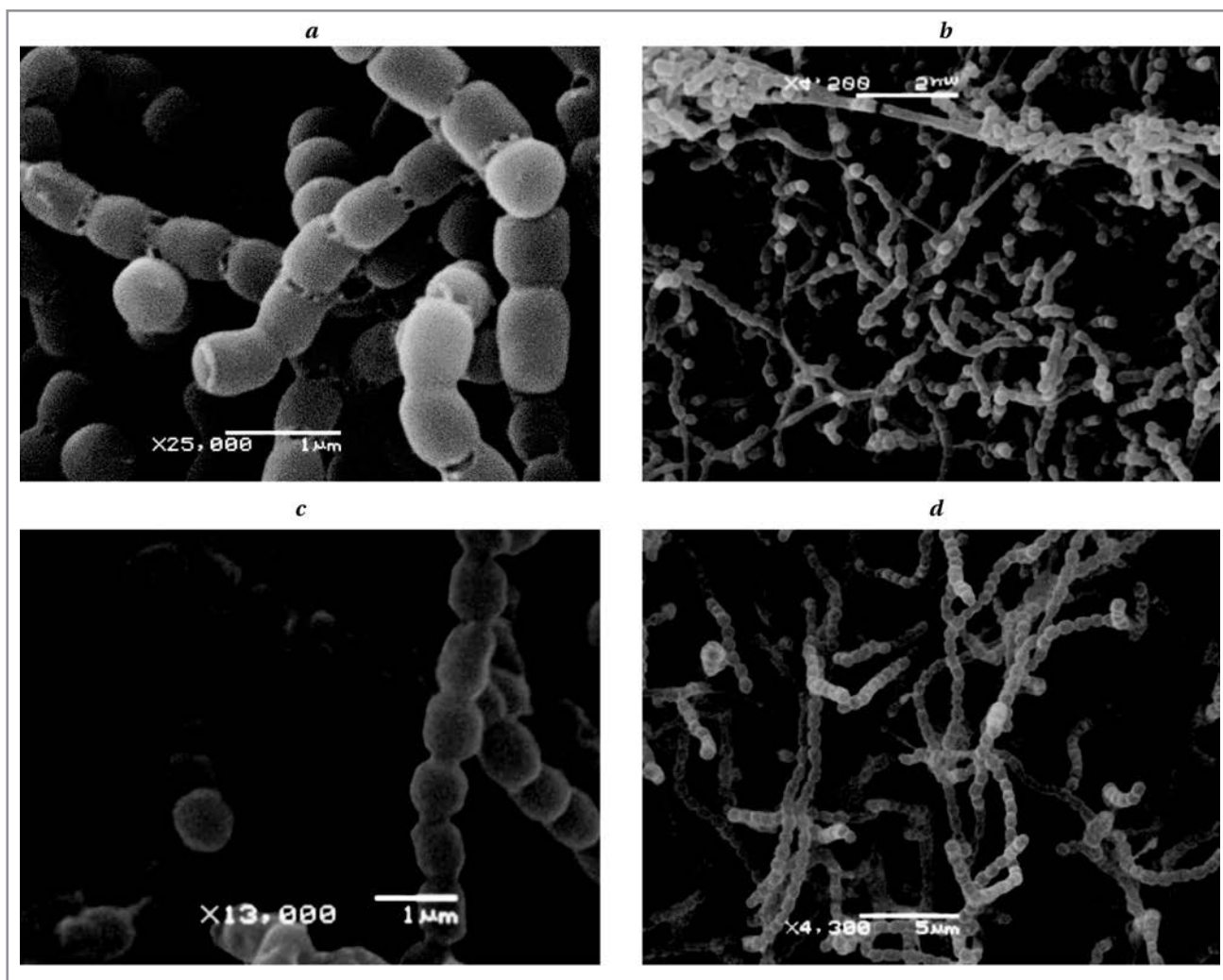
Для поиска антимикотиков анализировали 10 штаммов актиномицетов, которые, по пред-

варительным данным, проявляют противогрибковую активность против тест-штаммов *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01129 и/или *Aspergillus niger* ИНА 00760. Была проведена идентификация видов на основе сравнения последовательностей ДНК анализируемых штаммов-продуцентов с последовательностями в базах данных. Часть последовательностей была депонирована в GenBank (табл. 1).

По морфологическим признакам видовая идентификация этих штаммов соответствует результатам генного анализа [6, 7]. Все штаммы были выделены из разных образцов почвы. Два штамма *S. hydrogenans* несколько отличаются друг от друга по количеству спор в цепочках и характере соединения спор, однако оба штамма соответствуют описанию вида (рисунок).

При глубинном культивировании спектры антимикробной активности определяли в отношении шести коллекционных тест-штаммов. Помимо противогрибковой активности все 10 штаммов проявляли активность против грамположительных бактерий, включая 6 штаммов, активных против метициллинорезистентного штамма *Staphylococcus aureus* (MRSA), и 9 штаммов против *Leuconostoc mesenteroides* с высоким уровнем устойчивости к ванкомицину (512 мкг/мл). Кроме того, было показано, что три штамма активны против граммотрицательной бактерии (*E. coli* ATCC 25922). Среды, при росте на которых наблюдали самый высокий уровень противогрибковой активности, также приведены в табл. 2.

На следующем этапе работы была определена антимикотическая активность культуральной жидкости актиномицетов в отношении клинических изолятов дрожжей (табл. 3). Было обнаружено, что, за исключением трёх штаммов (*S. antibioticus* ИНА 01148, *S. chartreusis* ИНА 01259 и *S. peucetius* ИНА 01255), остальные семь актиномицетов активны в отношении клинических изолятов дрожжей, устойчивых к медицинским антимикотикам. Штамм *S. hydrogenans* ИНА 01215 проявляет противогрибковую активность для всех клинических изолятов, т. е. он активен *in*



Сравнение спор и спороносцев двух штаммов *S. hydrogenans*, выращенных на соевой агаровой среде в течение 12 сут: ИНА 01212 (a, b) и ИНА 01215 (c, d).

Comparison of spores and spore carriers of two *S. hydrogenans* strains (grown on soy agar medium for 12 days): ИНА 01212 (a, b) and ИНА 01215 (c, d).

vitro, когда шесть медицинских противогрибковых препаратов неэффективны. Ранее нами было показано, что другой штамм этого вида, ИНА 01212, также образует противогрибковые антибиотики и подавляет рост фитопатогенных грибов [8].

Актиномицеты как продуценты антибиотиков представляют собой хорошо изученную группу микроорганизмов. Основное количество антибиотиков, образуемых актиномицетами, было описано в 1950–80 гг. После выяснения видовой принадлежности и спектров антимикробной активности мы сравнили полученные результаты с данными литературы по изучаемым видам (табл. 4, 5).

При сравнении данных литературы и полученных результатов были отобраны пять штаммов актиномицетов, которые относятся к видам, для которых определённая антимикробная активность была ранее неизвестна: *N. soli* ИНА 01217

(активность в отношении грамотрицательных бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов), *S. bototropensis* ИНА 01214 и *S. netropsis* ИНА 01190 (активность в отношении дрожжей и мицелиальных грибов), *S. chromofuscus* ИНА 01211 (активность против дрожжей), *S. peucetius* ИНА 01255 (активность против мицелиальных грибов) (см. табл. 5). Четверо из них проявили противогрибковую активность против устойчивых клинических изолятов дрожжей: *N. soli* ИНА 01217, *S. bototropensis* ИНА 01214, *S. chromofuscus* ИНА 01211 и *S. netropsis* ИНА 01190 (см. табл. 3, 5). Мы считаем эти четыре штамма перспективными для химического изучения образуемых антигрибковых антибиотиков.

Из табл. 5 следует, что актиномицет *N. soli* ИНА 01217 ингибирует рост грамотрицательных бактерий, хотя мы не нашли информации об этом в литературе. Антимикробные соединения, ак-

Таблица 2. Спектры антимикробной активности культуры жидкости актиномицетов, выращенных в разных жидких средах
Table 2. Spectra of culture liquid antimicrobial activity of actinomycetes grown in different liquid media

Виды, штаммы	Актиномицеты	рост на средах, оптимальных для проявления противогрибковой активности	Тест-штаммы					
			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> РИД 259	<i>Aspergillus niger</i> ИНА 00760	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> BKПМ В-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Streptomyces antibioticus</i> ИНА 01148		D (5339)	+++	+++	++++	++++	++++	—
<i>S. netropsis</i> ИНА 01190		B (A4)	++++	+++	+++	++++	+++	++
<i>S. chromofuscus</i> ИНА 01211		B (A4)	+++	++++	+++	—	++++	—
<i>S. hydrogenans</i> ИНА 01212		C (Suc), F (330)	++++	++++	+++	—	++	—
<i>S. bototropensis</i> ИНА 01214		E (6613)	—	+++	+++	++	++	—
<i>S. hydrogenans</i> ИНА 01215		C (Suc), D (5339)	++++	++++	+++	—	—	—
<i>Nocardia soli</i> ИНА 01217		F (330)	++++	++++	—	++++	++++	+++
<i>S. lusitanus</i> ИНА 01218		B (A4)	—	+++	—	—	++++	—
<i>S. peucetius</i> ИНА 01255		D (5339)	—	+++	+++	++++	++++	++
<i>S. chartreusis</i> ИНА 01259		C (Suc)	—	++	++	+++	++	—

Примечание. Здесь и в табл. 3: зоны подавления роста тест-штаммов (мм) как показатель интенсивности антибиотической активности: «—» — нет активности; «+» — ≤ 10; «++» — 11–15; «+++» — 16–20; «++++» — >20.

Note. Here and in Table 3: Areas of test strains' growth inhibition (mm) as an indicator of the intensity of antibiotic activity: «—» — no activity; «+» — ≤ 10; «++» — 11–15; «+++» — 16–20; «++++» — >20.

Таблица 3. Противогрибковая активность культуры жидкости актиномицетов в отношении клинических изолятов дрожжей
Table 3. Antifungal activity of actinomycete culture broth against clinical yeast isolates

Виды, штаммы	Актиномицеты	рост на средах, оптимальных для проявления противогрибковой активности	Клинические изоляты дрожжей							
			<i>Candida albicans</i> 5430	<i>Candida albicans</i> 6503	<i>Candida famata</i> 6311	<i>Candida parapsilosis</i> 6314	<i>Cryptococcus neoformans</i> 6392	<i>Candida neoformans</i> 7248		
<i>Streptomyces antibioticus</i> ИНА 01148		D (5339)	—	—	—	—	—	—		
<i>S. netropsis</i> ИНА 01190		B (A4)	++	—	—	++	++	++		
<i>S. chromofuscus</i> ИНА 01211		B (A4)	+++	+++	++	++	—	++		
<i>S. hydrogenans</i> ИНА 01212		C (Suc), F (330)	+++	+++	+++	+++	—	++		
<i>S. bototropensis</i> ИНА 01214		E (6613)	—	—	—	—	++++	—		
<i>S. hydrogenans</i> ИНА 01215		D (5339)	+++	+++	+++	+++	++++	++++		
<i>Nocardia soli</i> ИНА 01217		F (330)	+++	+++	—	+++	++++	—		
<i>S. lusitanus</i> ИНА 01218		B (A4)	+++	+++	—	+++	—	+		
<i>S. peucetius</i> ИНА 01255		D (5339)	—	—	—	—	—	—		
<i>S. chartreusis</i> ИНА 01259		C (Suc)	—	—	—	—	—	—		
R — антимикотики, к которым устойчивы клинические изоляты*			MCZ, KET, ITR, FLU	AB	5FC, ITR, FLU	5FC, MCZ, KET, ITR, FLU	MCZ, ITR, FLU	AB		
I — антимикотики, к которым клинические изоляты проявляют промежуточный уровень чувствительности*			—	ITR	MCZ, KET	—	KET	MCZ, ITR, FLU		
S — антимикотики, к которым чувствительны клинические изоляты*			5FC, AB	5FC, MCZ, KET, FLU	AB	AB	5FC, AB	5FC, KET		

Примечание. * — антимикотики медицинского назначения: 5FC — 5-фторцитозин; AB — амфотерицин В; MCZ — миконазол; KET — кетоконазол; ITR — итраконазол; FLU — флуконазол.

Note. * — Antimycotics for medical purposes: 5FC — 5-fluorocytosine; AB — amphotericin B; MCZ — miconazole; KET — ketoconazole; ITR — itraconazole; FLU — fluconazole.

Таблица 4. Антибиотики, ранее описанные у представителей исследуемых видов
Table 4. Antibiotics previously described in representatives of the studied species

Виды	Антибиотики		Ссылки
	название	чувствительные микроорганизмы	
<i>Nocardia soli</i>	Тиолактомицин	Грамположительные бактерии	9, 10
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Олеандомицин	Грамположительные и грамотрицательные бактерии	11, 12
	Симициклиноны	Грамположительные бактерии	13
	Актиномицин D	Грамположительные и грамотрицательные бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы	14
	Боромицин	Грамположительные бактерии	15
<i>S.bottropensis</i>	Боттромицин	Грамположительные бактерии	16
	Олигомициновые антибиотики, 44-гомоолигомицин A (NK86-0279 II) и B (NK86-0279 I)	Мицелиальные грибы	17
<i>S.chartreusis</i>	Шартрезин	Грамположительные бактерии, в том числе возбудитель туберкулеза	18
	Кальцимицин (A23187)	Грамположительные бактерии и мицелиальные грибы	19
<i>S.chromofuscus</i>	Гербоксиdien	Умеренная активность против гриба <i>Phytophthora megasperma</i> var. <i>glycine</i>	20
	Антрациклины SM-173A (= аранциамицин) и SM-173B	Грамположительные бактерии, включая <i>Mycobacterium</i> sp. и <i>Staphylococcus</i> sp.	21, 22
<i>S.hydrogenans</i>	Актиномицин D	Грамположительные и грамотрицательные бактерии, мицелиальные грибы	8, 23
<i>S.lusitanus</i>	Цианоциклины A-D	Цианоциклин A проявляет широкий спектр антимикробной и противоопухолевой активности	24, 25
	Нафтиридиномицин	Грамположительные и грамотрицательные бактерии	26
	7-хлортетрациклин, тетрациклин	Грамположительные и грамотрицательные бактерии	27
	Антимицин B2	Умеренная активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий	28
	N-десметилнафтиридиномицин	Грамположительные и грамотрицательные бактерии	26
<i>S.netropsis</i>	Нетропсин	Грамположительные и грамотрицательные бактерии	29
<i>S.peucetius</i>	Адриамицин и дауномицин	Грамположительные и грамотрицательные бактерии	30–32

тивные в отношении грамотрицательных бактерий и образованные этим штаммом, также целесообразно идентифицировать.

Обсуждение

Распространение резистентных форм в популяциях патогенных микроорганизмов постоянно увеличивается. По данным Американского общества инфекционных заболеваний, в 2009 г. было выявлено семь видов бактерий, в популяциях которых были широко распространены штаммы с множественной устойчивостью к антибиотикам [33]. В 2017 г. Всемирная организация здравоохранения представила список патогенных микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, состоящий из 12 видов, чтобы обозначить приоритеты в исследованиях и разработке новых и эффективных методов лечения антибиотиками. ВОЗ оценила темпы и масштабы распространения резистентных патогенов как серьёзную глобальную угрозу для человечества [34]. Условно-патогенные и патогенные грибы не входят в этот список, но их растущее распространение также очевидно [35,

36]. В связи со сложившейся ситуацией поиск новых противогрибковых антибиотиков является важной задачей. Несмотря на внедрение молекулярных методов поиска новых антибиотиков *in vitro*, общий результат незначителен [33–39]. Использование традиционных схем работы с продуцентами антибиотиков требует совершенствования, например, отбора наиболее перспективных продуцентов на ранних этапах отбора. Актиномицеты и грибы остаются основным источником новых биологически активных соединений [3, 40]. Актиномицеты разных видов выделяются из природы с разными частотами. Например, продуцент даптомицина выделяют из почвы с частотой один на десять миллионов, эритромицин — один на миллион, ванкомицин — один на сто тысяч, хлорамфеникол — один на десять тысяч, а стрептомицин, актиномицин D и стрептотрицин — менее одного на тысячу [41]. В связи с этим нам представляется важной идентификация вида после обнаружения антибиотической активности у природного штамма, выделенного в культуру.

Вторым важным обстоятельством мы считаем определение антимикробной активности не

Таблица 5. Сравнение антимикробной активности исследуемых штаммов с опубликованными данными по соответствующим видам

Table 5. Comparison of the antimicrobial activity of the studied strains with published data concerning the corresponding species*

Виды, штаммы	Активность против разных групп микроорганизмов, изученных во время настоящего эксперимента				Активность против разных групп микроорганизмов (по литературным данным; табл. 4)			
	грам+	грам–	дрожжи	грибы	грам+	грам–	дрожжи	грибы
<i>Streptomyces antibioticus</i> INA 01148	•	о	о	•	•	•	•	•
<i>S. netropsis</i> ИНА 01190	•	•	△	△	•	•	нд	нд
<i>S. chromofuscus</i> ИНА 01211	•	о	△	•	•	о	о	•
<i>S. hydrogenans</i> ИНА 01212	•	о	•	•	•	•	•	•
<i>S. bottropensis</i> ИНА 01214	•	о	△	△	•	о	о	о
<i>S. hydrogenans</i> ИНА 01215	•	о	•	•	•	•	•	•
<i>Nocardia soli</i> ИНА 01217	•	△	△	△	•	о	о	о
<i>S. lusitanus</i> ИНА 01218	•	о	•	•	•	•	•	•
<i>S. peucetius</i> ИНА 01255	•	•	о	△	•	•	о	о
<i>S. chartreusis</i> ИНА 01259	•	о	о	•	•	нд	нд	•

Примечание. «•» — антимикробная активность оценена против, по меньшей мере, одного исследованного штамма данного вида; «о» — антимикробная активность не обнаружена ни в одном из изученных штаммов данного вида; «△» — антимикробная активность данного вида была впервые установлена в отношении по крайней мере одного из протестированных штаммов или клинических изолятов в ходе данного эксперимента; «нд» — нет данных.

Note. «•» — antimicrobial activity has been evaluated against at least one tested strain of the given species; «о» — antimicrobial activity was not detected in any of the studied strains of the given species; «△» — the antimicrobial activity of the species was first established against at least one of the tested strains or clinical isolates during this experiment; (нд) — no data.

только в отношении коллекционных тест-штаммов, но и клинических изолятов с определённым спектром устойчивости к медицинским антибиотикам. При выделении штаммов актиномицетов из природы и культивировании на разработанных средах процент продуцентов варьируется от 15 до 50%. Этот разброс зависит не только от биоразнообразия природного источника, но также и от опыта исследователя, который при выборе клонов актиномицетов может, основываясь на морфологических характеристиках, идентифицировать и отклонить некоторые хорошо описанные виды, которые продуцируют хорошо известные антибиотики. Продуценты противогрибковых антибиотиков составляют около 1/5 от общего числа штаммов-продуцентов, то есть 3–10% от выделенных природных актиномицетов. Соответственно, 10 штаммов продуцентов антимикотиков, активных против двух тестируемых штаммов грибов, были отобраны приблизительно из 330–100 природных изолятов актиномицетов.

Литература/References

- Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Available online: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>.
- O'Neill J. The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations, 2016. Available online: http://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf.
- Berdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. J Antibiot. 2012; 65: 385–395.
- Ефименко Т.А., Терехова Л.П., Ефременкова О.В. Современное состояние проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий. Антибиотики и химиотер. 2019; 64: 5–6, 64–68. [Efimenko T.A., Terekhova L.P., Efremenkova O.V. Current state the problem of antibiotic resistance of pathogens. Antibiotiki i Khimioter. 2019; 64 (5-6): 64–68. (in Russian)]
- Glukhova A.A., Karabanova A.A., Yakushev A.V., Semenyuk I.I., Boykova Y.V., Malkina N.D., Efimenko T.A., Ivankova T.D., Terekhova L.P., Efremen-

Благодаря сотрудничеству академического института и клинического центра мы смогли определить 4 самых обнадёживающих продуцентов для химических исследований с целью изыскания новых антибиотиков.

Заключение

Актиномицеты по-прежнему являются важными объектами поиска новых антибиотиков. Для повышения эффективности поиска мы считаем целесообразным отбирать потенциальные продуценты антибиотиков на основе видовой принадлежности с учётом предыдущих научных публикаций по соответствующим видам, а также активности, продемонстрированной изученными штаммами в отношении клинических изолятов с множественной устойчивостью к антибиотикам.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

- kova O.V. Antibiotic Activity of Actinobacteria from Digestive Tract of Millipede *Nedyopus dawydoffiae* (Diplopoda). Antibiotics (Basel). 2018; 7: 4: 94. doi: 10.3390/antibiotics7040094.
- Valagurova E.V., Kozyrtskaya V.E., Iutinskaya G.A. Actinomycetes of *Streptomyces* genus. (in Russian) Publisher «Scientific Book»: Kiev, Ukraine, 2003; 1–645.
- Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Suzuki K., Ludwig W., Whitman W.B. (eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed.; Springer-Verlag, New York, USA; 2012; 5: A: 376–419, 1455–1768.
- Demiankova M.V., Kalashnikova E.A., Glukhova A.A., Ivankova T.D., Terekhova L.P., Boykova Y.V., Efimenko T.A., Efremenkova O.V. Activity of the strain *Streptomyces hydrogenans* against phytopathogenic fungi. Open Acc J Envi Soi Sci (OAJESS). 2018; 1: 5:103–105, doi:10.32474/OAJESS.2018.01.000121.
- Brown M.S., Akopiants K., Resceck D.M., McArthur H.A.I., McCormick E., Reynolds K.A. Biosynthetic Origins of the natural product, thiolactomycin: A unique and selective inhibitor of type II dissociated fatty acid synthases. J Am Chem Soc. 2003; 125 (34): 10166–10167. doi: 10.1021/ja034540i.

10. Fulmer T. Fatty acid synthase II (FASII) pathway. Science-Business eX-change 2009, 2, 11, 430–430. doi: 10.1038/scibx.2009.430.
11. Tatsuta K., Gunji H., Tajima S., Ishiyama T., Imai S., Okuyama S., Fukatsu S. Biosynthetic studies on oleandomycin by incorporation of the chemically synthesized aglycones. J Antibiot. 1990; 43: 909–911. doi: 10.7164/antibiotics.43.909.
12. Vilches C., Hernandez C., Mendez C., Salas J.A. Role of glycosylation and deglycosylation in biosynthesis of and resistance to oleandomycin in the producer organism, *Streptomyces antibioticus*. J Bact. 1992; 174: 1: 161–165. doi: 10.1128/jb.174.1.161-165.1992.
13. Shimana J., Fiedler H.-P., Groth I., Submuth R., Beil W., Walker M., Zeeck A. Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. J Antibiot. 2000; 53 (8): 779–787. doi: 10.7164/antibiotics.53.779.
14. Hollstein U. Actinomycin. Chemistry and mechanism of action. Chem Rev. 1974; 74 (6): 625–652. doi: 10.1021/cr60292a002.
15. Hütter R., Keller-Schierlein W., Knüsel F., Prelog V., Rodgers G. C. The metabolic products of microorganisms. Boromycin. Helvetica Chimica Acta. 1967; 50 (6): 1533–1539.
16. Waisvisz J.M., van der Hoeven M.G., van Peppen J., Zwennis W.C.M. Botromycin. I. A new sulfur-containing antibiotic. J Am Chem Soc. 1957; 79 (16): 4520–4521. doi: 10.1021/ja01573a072.
17. Yamazaki M., Yamashita T., Harada T., Nishikiori T., Saito S., Shimada N., Fujii A. 44-Homooligomycins A and B, new anti-tumor antibiotics from *Streptomyces bottropensis* producing organisms, fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties. J Antibiot. 1992; 45 (2): 171–179. doi: 10.7164/antibiotics.45.171.
18. Leach B.E., Calhoun K.M., Johnson LeRoy E., Teeters C.M., Jackson W.G. Char-treusin, a new antibiotic produced by *Streptomyces chartreusis*, a new species. J Am Chem Soc. 1953; 75 (16): 4011–4012. doi: 10.1021/ja01112a040.
19. Wu Q., Liang J., Lin S., Zhou X., Bai L., Deng Z., Wang Z. Characterization of the biosynthesis gene cluster for the pyrrole polyether antibiotic calcimycin (A23187) in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882. Antim Agent Chem. 2011; 55 (3): 974–982. doi: 10.1128/AAC.01130-10.
20. Miller-Wideman M., Makkar N., Tran M., Isaac B., Biest N., Stonard R. Herboxidiene, a new herbicidal substance from *Streptomyces chromofuscus* A7847. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. J Antibiot (Tokyo). 1992; 45 (6): 914–921. doi: 10.7164/antibiotics.45.914.
21. Fujiwara A., Tazoe M., Hoshino T., Sekine Y., Fujiwara M. Structural studies of an antracyclinone antibiotic SM-173B produced by *Streptomyces chromofuscus* SM-173. Symposium on the Chemistry of Natural Products, symposium papers. 1979; 22: Abstr. No. 59: 448–455.
22. Akiko F., Mitsuhiro F., Tatsuo H., Yuzuru S., Masaaki T. Antibiotic SM-173B. Patent US 4206129, June 3, 1980.
23. Kulkarni M., Gorthi S., Banerjee G., Chattopadhyay P. Production, characterization and optimization of actinomycin D from *Streptomyces hydrogans* IB310, an antagonistic bacterium against phytopathogens. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2017, 10, 69–74. doi: 10.1016/j.bcab.2017.02.009.
24. Hayashi T., Noto T., Nawata Y., Okazaki H., Sawada M., Ando K. Cyanocycline A, a new antibiotic. Taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation and characterization. J Antibiot (Tokyo). 1982; 35 (7): 771–777. doi: 10.7164/antibiotics.35.771.
25. Gould S.J., He W., Cone M.C. New cyanocyclines from a cyanide-treated broth of *Streptomyces lusitanus*. J Nat Prod. 1993; 56 (8): 1239–1245. doi: 10.1021/np50098a006.
26. Kluepfel D., Baker H. A., Piattoni G., Sehgal S. N., Sidorowicz A., Singh K., Vezina C. Naphthyridinomycin, a new broad-spectrum antibiotic. J Antibiot (Tokyo). 1975; 28 (7): 497–502. doi: 10.7164/antibiotics.28.497.
27. Villax I. Process of fermentation of chlortetracycline and tetracycline antibiotics. Patent US 3401088 A. Sept., 10, 1968.
28. Han Z., Xu Y., McConnell O., Liu L., Li Y., Qi S., Huang X., Qian P. Two antimycin A analogues from marine-derived actinomycete *Streptomyces lusitanus*. Mar Drugs. 2012; 10 (3): 668–676. doi: 10.3390/md10030668.
29. Finlay A.C., Hochstein E.A., Sobin B.A., Murphy E.X. Netropsin, a New antibiotic produced by a *Streptomyces*. J Am Chem Soc. 1951; 73 (1): 341–343. doi: 10.1021/ja01145a113.
30. Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Pol C., Spalla C. Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Biotechnology and Bioengineering, 1969; 11 (6) 1101–1110. doi: 10.1002/bit.260110607.
31. Grein A., Spalla C., Di Marco A., Canevazzi G. Descrizione e classificazione di un attinomiceti (*Streptomyces peucetius* sp. *nova*) produttore di una sostanza attività antitumorale: La daunomicina. (in Italian) G Microbiol. 1963; 11: 109–118.
32. Guilfoile P.G., Hutchinson C.R. A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin. PNAS. 1991; 88 (19): 8553–8557. doi: 10.1073/pnas.88.19.8553.
33. Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! Clin Infect Dis. 2009; 48 (1): 1–12. doi: 10.1086/595011.
34. Tacconelli E., Magrini N., World Health Organisation. 2017, Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Available on line: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
35. Beardsley J., Halliday C.L., Chen S.C.-A., Sorrell T.C. Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. Future Microbiol. 2018, 13, 10, 1175–1191. doi: 10.2217/fmb-2018-0059.
36. Fisher M.C., Hawkins N.J., Sanglard D., Gurr S.J. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. Science. 2018; 360 (6390): 739–742. doi: 10.1126/science.aap7999.
37. Butler M.S., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. J Antibiot. 2011; 64 (6): 413–425. doi: 10.1038/ja.2011.44.
38. Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. J Antibiot. 2013; 66 (10): 571–591. doi: 10.1038/ja.2013.86.
39. Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. J Antibiot. 2017; 70 (1): 3–24. doi: 10.1038/ja.2016.72.
40. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot. 2005; 58 (1): 1–26. doi: 10.1038/ja.2005.
41. Baltz R.H. Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? J Ind Microbiol Biotechnol. 2006; 33 (7): 507–513. doi: 10.1007/s10295-005-0077-9.

Информация об авторах

Демьянкова Мария Владимировна — м. н. с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Российская Федерация

Садикова Вера Сергеевна — зав. лаб. таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов, зам. директора ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Российская Федерация

Глухова Алла Алексеевна — н. с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Российская Федерация

Ефименко Татьяна Александровна — с. н. с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Российская Федерация

Бойкова Юлия Вадимовна — н. с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Российская Федерация

About the authors

Mariya V. Demiankova — Junior Researcher, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

Vera S. Sadykova — Head of the Laboratory of Taxonomic Study and Collection of Microorganism Cultures, Deputy Director, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

Alla A. Glukhova — Researcher, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

Tatiana A. Efimenko — Senior Researcher, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

Yuliya V. Boykova — Researcher, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

Малкина Наталья Дмитриевна — н. с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Российская Федерация

Кормилицина Виктория Георгиевна — лаборант-исследователь, ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Шарапченко Софья Олеговна — лаборант-исследователь, ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Сумарукова Ирина Георгиевна — н. с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Российская Федерация

Васильева Бязиля Ф. — н. с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Российская Федерация

Иванкова Татьяна Дмитриевна — м. н. с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Российская Федерация

Терехова Лариса Петровна — ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Российская Федерация

Габриэлян Нина Индзаровна — заведующая отделом, ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Ефременкова Ольга Владимировна — заведующий сектором, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Российская Федерация

Natalia D. Malkina — Researcher, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

Victoria G. Kormilitsina — Laboratory Assistant-Researcher, Academician V. I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

Sofya O. Sharapchenko — Laboratory Assistant-Researcher, Academician V. I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

Irina G. Sumarukova — Researcher, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

Byazilya F. Vasilieva — Researcher, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

Tatiana D. Ivankova — Junior Researcher, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

Larissa P. Terekhova — Leading Researcher, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

Nina I. Gabrielyan — Head of Department, Academician V. I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

Olga V. Efremenkova — Head of the Sector, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation