

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2014 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2014

УДК 579.83

*Т.А. Ефименко, И.А. Маланичева, В.А. Зенкова, М.И. Резникова,
А.М. Королев, О.В. Ефременкова*

ИЗЫСКАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ СРЕДИ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва, Россия

Цель. Поиск продуцентов новых природных антибиотиков, эффективных в отношении болезнетворных форм бактерий с устойчивостью к антибиотикам.

Материалы и методы. Из ткани плодовых тел базидиальных грибов выделяли бактериальные штаммы, у которых при глубинном культивировании определяли антибиотическую активность в отношении 12 бактериальных и грибных тест-культур. Химическими методами выделены и исследованы антибиотики, образуемые двумя бактериальными штаммами. Микробиологическими и генетическими методами определена принадлежность двух бактериальных продуцентов к виду *Bacillus subtilis*.

Результаты. Из плодовых тел базидиальных грибов выделены 88 бактериальных штаммов, из которых 68 (77%) в условиях глубинного культивирования образуют антибиотики. 31 штамм образует антибиотики, эффективные в отношении тест-штамма метициллинрезистентного стафилококка.

Заключение. Плодовые тела базидиальных грибов являются перспективным источником бактерий-продуцентов антибиотиков, в том числе эффективных в отношении устойчивых к антибиотикам тест-бактерий. Описаны новые пептидные антибиотики *B. subtilis*.

Ключевые слова: бактерии, продуценты антибиотиков, базидиальные грибы, антибиотикорезистентность, метициллинрезистентность, *Bacillus subtilis*.

*T.A. Efimenko, I.A. Malanicheva, V.A. Zenkova, M.I. Resnikova,
A.M. Korolev, O.V. Efremenkova*

SEARCHING FOR NEW ANTIBIOTIC PRODUCERS AMONG BACTERIA, ISOLATED FROM FRUITING BODIES OF BASIDIAL FUNGI

Gause Institute of New Antibiotics Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Objective. Searching for new producers of natural antibiotics effective against pathogenic forms of bacteria resistant to antibiotics.

Materials and methods. From fabric of basidiomycete fruiting bodies were isolated bacterial strains. In cultural liquid of isolated bacterial strains was determined antibiotic activity against 12 bacterial and fungal test cultures. By chemical methods are highlighted and investigated antibiotics produced by two bacterial strains. By microbiological and genetic methods was determined utensils of these bacterial producers to species *Bacillus subtilis*.

Results. From the fruiting bodies of basidiomycetes are highlighted 88 bacterial strains, of which 68 (77%) in submerged culture produce antibiotics. 31 strain produce antibiotics effective against methicillin-resistant test strain of *Staphylococcus aureus*.

Conclusions. Fruiting bodies of basidiomycetes are a promising source of bacteria - producers of antibiotics, including effective against antibiotic-resistant forms of the test bacteria. Discloses novel peptide antibiotics produced by *B. subtilis*.

Key words: bacteria, antibiotic producers, basidial fungi, antibiotic resistance, methicillin-resistance, *Bacillus subtilis*.

Введение

Внедрение в медицинскую практику таких мощных лекарственных средств, как антибиотики, было настоящей революцией в лечении инфекционных заболеваний. Однако по мере их применения ответной реакцией патогенных микроорганизмов была выработка устойчивости к антибиотикам. В настоящее время в медицине все острее встает проблема антибиотикорезистентности возбудителей, и одним из направлений решения этой проблемы является изыскание новых соединений, преодолевающих лекарственную устойчивость патогенных микроорганизмов, которые могли бы пополнить существенно уменьшившийся арсенал эффективных лекарственных средств.

Проблема быстрого распространения антибиотикорезистентности среди патогенных микроорганизмов носит глобальный характер. По данным ВОЗ, с 2000 по 2013 годы в мире описано только 22 новых антибиотика, одобренных национальными агентствами для проведения клинических испытаний. Из них новыми природными антибиотиками были только 2, а 10 представляют продукты трансформации ранее описанных природных антибиотиков и 10 соединений синтезированы искусственно [1]. Такое незначительное количество новых антибактериальных соединений, доведенных до стадии клинических исследований, требует внедрения новых подходов к изысканию новых природных антибиотиков.

Если рассматривать антибиотики в качестве химического оружия у образующих их организмов для межвидовой борьбы, то наиболее перспективным источником штаммов-продуцентов является такой сложный биоценоз, как почва, которая, действительно, была на протяжении десятилетий основным объектом поиска продуцентов новых антибиотиков, поскольку она представляет собой сложное сообщество организмов разных систематических групп, из которых самыми перспективными и хорошо изученными продуцентами антибиотиков были актиномицеты [2]. В настоящее время поиск расширяется, и исследуются самые разнообразные биоценозы, например, донные отложения, микрофлора кишечника беспозвоночных, симбионты морских организмов, эндобионты растений и др. [3].

Основная задача наших исследований заключается в изыскании новых антибиотиков природного происхождения, эффективных в отношении метициллинрезистентных бактерий, а также бактерий, устойчивых к гликопеп-

тидным антибиотикам ванкомициновой группы. Объектами исследования наряду с базидиальными грибами являются микроорганизмы, выделяемые из плодовых тел этих грибов, преимущественно бактерии. Отмечено, что при выделении в культуру высших грибов бывает сложно отделить сопутствующие бактерии, которые, с лабораторной точки зрения, рассматриваются в качестве контаминантов грибов, а, с экологической точки зрения, могут являться их симбионтами и проявлять выраженную антимикробную активность.

Цель настоящего исследования заключалась в создании коллекции бактерий, выделенных из плодовых тел базидиомицетов, и анализе их антибиотических свойств.

Материалы и методы

Плодовые тела грибов собирали в Москве, Московской и Архангельской областях в 2010-2013 гг. Для выделения грибов в культуру использовали тканевый метод: надсекали стерильным скальпелем гриб, разламывали его и стерильной микробиологической петлей, высевали кусочек ткани из сердцевины гриба на поверхность агара в чашку Петри. В ряде случаев помимо грибов наблюдали рост бактерий, которые отсевали на скошенный агар.

Для поверхностного культивирования использовали универсальную агаровую среду № 2 Гаузе следующего состава (%): глюкоза – 1, пептон – 0.5, триптон – 0.3, NaCl – 0.5, агар – 2; pH 7.2-7.4. Для глубинного культивирования использовали ту же среду без агара. Глубинное культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 100 мл среды, на роторной качалке (220 об/мин).

В качестве тест-культур для определения антимикробной активности использовали следующие микроорганизмы: грамположительные бактерии – *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. pumilus* NCTC 8241, *B. mycoides* 537, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177 (штамм, устойчивый к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина; VRSA), *Staphylococcus aureus* FDA 209P (MSSA), *S. aureus* INA 00761 (MRSA), грамотрицательные бактерии – *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, и грибы – *Aspergillus niger* INA 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259. Грибные тест-культуры и *L. mesenteroides* выращивали при температуре 28°C, все другие штаммы – при 37°C. Глубинное культивирование бактерий проводили при 28°C.

Микроскопирование осуществляли с помощью светового микроскопа Olympus VX41TF (Япония). При окрашивании по Граму в качестве положительного и отрицательного контроля использовали штаммы *B. subtilis* ATCC 6633 и *E. coli* ATCC 25922 соответственно. Подсчет титра бактериальных клеток проводили в камере Горяева.

Антимикробную активность определяли методом диффузии в агар. Об уровне антимикробной активности судили по диаметрам зон задержки роста тест-культур вокруг лунок или дисков.

Для анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК бактериальных штаммов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали универсальные консервативные праймеры 27f, 341f, 785f, 519r, 907r, 1492r. Были выбраны режимы проведения ПЦР: (1) 94°C-5 мин, (2) 30 циклов с чередованием температурных интервалов 94°C-1мин, 51°C-1 мин, 72°C-2мин, (3) 72°C-7мин. Анализ продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле при напряженности электрического поля 5 В/см. Очистку продуктов ПЦР осуществляли методом прямого переосаждения ДНК в мягких условиях (0.125М ацетата аммония в 70% этиловом спирте). Секвенирование очищенных фрагментов ДНК проводили на секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США). Для анализа последовательностей и построения дерева родства использовали базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и Ribosomal Database Project (<http://www.cme.msu.edu>).

Выделение и физико-химическое изучение антибиотиков проводили ранее описанными химическими и физико-химическими методами [4]. Выделенные пептидные антибиотики сравнивали по физико-химическим и биологическим свойствам с антибиотиками, описанными в научной литературе, а также зарегистрированными в компьютерной базе данных природных биологически активных веществ BNPD (Я. Берди, Венгрия), которая была начата в 1977 г. [5] и постоянно обновляется авторами.

Результаты и обсуждение

Бактерии выделяли из свежесобранных плодовых тел базидиомицетов. В большинстве случаев из одного плодового тела гриба наблюдали рост бактерий одного вида и отсевали 1 штамм, лишь в единичных случаях – 2 или 3. Плодовые тела грибов (базидиомы) существуют от нескольких часов до нескольких суток и после формирования спор лизируются. Такая кратко суще-

ствующая биомасса может быть прекрасным субстратом для бактерий. Предположительно конкуренции между бактериями разных видов за колонизацию плодового тела гриба способствует образование и выделение в среду противобактериальных антибиотиков. Вероятно, вышесказанным можно объяснить то обстоятельство, что из одного плодового тела гриба, преимущественно, выделяется один вид бактерий. В этом случае проявляется закон конкурентного исключения Гаузе «один вид – одна экологическая ниша» [6].

Все выделенные 88 штаммов бактерий культивировали в глубинных условиях, и со 2 по 9 сутки определяли активность в отношении 12 тест-штаммов. Установлено, что 68 штаммов (77%) в описанных условиях проявляют антибиотическую активность. По данным наших многолетних исследований, среди выделенных из разных образцов почвы немикелиальных бактерий («эубактерий» или собственно бактерий), изученных в таких же условиях, количество продуцентов антибиотиков было значительно меньше и колебалось от 5 до 30%. В таблице 1 приводится сводка антимикробного спектра полученных бактериальных продуцентов.

Таблица 1. Антимикробный спектр веществ, образуемых бактериальными продуцентами

Тест-штаммы	Число (%) продуцентов
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA)	31 (45,5%)
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P (MSSA)	22 (32,3%)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	56 (82,4%)
<i>Bacillus pumilis</i> NCTC 8241	33 (48,5%)
<i>Bacillus mycoides</i> 537	30 (44%)
<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	32 (47%)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	5 (7%)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16 (23,5%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	20 (29,4%)
<i>Aspergillus niger</i> INA 00760	11 (16,1%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	3 (4,4%)

Из таблицы следует, что 31 штамм образует вещество (или вещества), эффективные в отношении метициллинрезистентного штамма *S. aureus* INA

00761 (MRSA), устойчивого к 32 мкг/мл оксациллина.

По мере распространения резистентных форм патогенных бактерий чаще стали использовать антибиотики группы ванкомицина, что, очевидно, привело к увеличению частоты обнаружения микроорганизмов, устойчивых к этой группе антибиотиков [7]. Среди использованных нами тест-культур природной высокой устойчивостью к ванкомицину (400 мкг/мл; VRSA) обладает штамм *L. mesenteroides* VKPM В-4177, в отношении которого также выявлена антибиотическая активность у 5 (7%) бактериальных продуцентов.

Из 88 выделенных бактерий для изучения образуемых антибиотиков были выбраны штаммы INA 01085 и INA 01086, которые получены в качестве стойких контаминантов при выделении в культуру тканевым методом базидиомицетного гриба чешуйчатки обыкновенной (*Pholiota squarrosa*) из плодового тела, найденного на клене ясенелистом (*Acer negundo*) в г. Москве. По морфологическим признакам оба штамма бактерий соответствовали представителям рода *Bacillus*: грамположительные палочки 3x0,5 мкм, образующие эндоспоры, содержание которых к 4 суткам близко к 100%. Они образуют округлые бежевые колонии и выделяют в агаровую среду розоватый пигмент. Морфологическое различие между двумя штаммами заключается в том, что первый (INA 01085) – растет в виде кожистых складчатых колоний, а второй (INA 01086) – образует ровные гладкие колонии.

Для дальнейшего изучения этих штаммов амплифицировали ген 16S рРНК с помощью ПЦР и проводили секвенирование продукта амплификации. Получены последовательности переменных участков длиной 1091 и 958 п.о. штаммов INA 01085 и INA 01086, которые депонированы нами в GenBank под номерами KF311228 и KF311227 соответственно. Первичный скрининг по этой базе данных показал, что анализируемые последовательности ДНК на 100% совпадают с последовательностями типовых штаммов *B. subtilis*.

Затем последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями типовых штаммов ближайших видов бактерий из базы данных RPD. С помощью программы Mega 5.2.2 на основе типовых штаммов было построено дерево филогенетического родства (рис. 1).

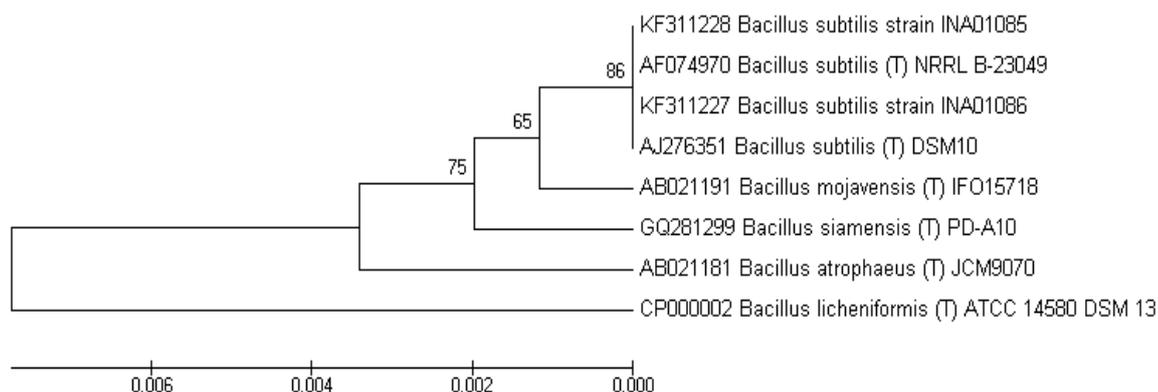


Рис. 1. Филогенетическое положение штаммов INA 01085 и INA 01086 на основании последовательности гена 16SpPHK. Масштаб – 2 нуклеотидные замены на 1000 нуклеотидов. Цифрами обозначена достоверность ветвления по «bootstrap»-анализу 100 альтернативных деревьев.

Глубинное культивирование этих штаммов бактерий проводили в две стадии: с агаровой среды петлей вносили посевной материал в колбы и выращивали на качалке 2 суток. Затем с помощью микроскопирования определяли титр клеток и переносили полученный в глубинной культуре посевной материал в колбы со свежей средой в количестве 10^5 клеток/мл среды для проведения второй стадии культивирования, длившейся 9 суток.

Установлено, что культуральная жидкость обоих штаммов содержит антимикробные вещества, эффективные в отношении всех применявшихся грамположительных тест-бактерий, а также в отношении *E. coli* ATCC 25922 (рис. 2).

При этом наивысший уровень активности в отношении грамположительных тест-бактерий наблюдали на 2-4 сутки культивирования с последующим понижением активности и ее исчезновением на 7-8 сутки.

В отношении тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 антимикробная активность культуральной жидкости проявлялась в первые трое суток роста, достигая пика на 2-3 сутки и исчезая к 4 суткам.

Штамм INA 01085 также проявлял на низком уровне противогрибковую активность в отношении *A. niger* INA 00760 и *S. cerevisiae* RIA 259, а штамм INA 01086 – только следы противогрибковой активности в отношении *A. niger* INA 00760.

Оба штамма неактивны в отношении тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853.

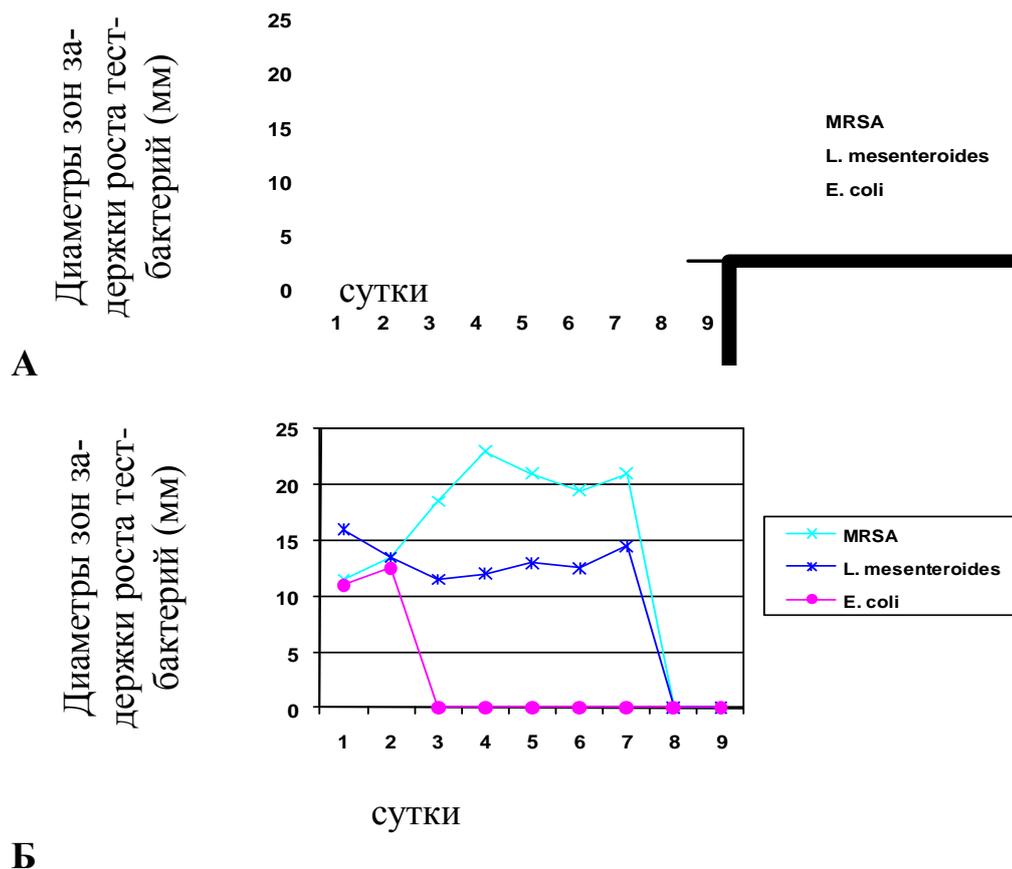


Рис. 2. Проявление антимикробной активности в культуральной жидкости штаммов *B. subtilis* INA 01085 (А) и INA 01086 (Б) в зависимости от длительности культивирования, выраженной в диаметрах зон задержки роста (в мм) следующих тест-штаммов бактерий: *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA), *Leuconostoc mesenteroides* VKPM В-4177, *Escherichia coli* ATCC 25922.

На основании UV-VIS-спектрофотометрического анализа установлены продуцируемые этими бактериями антибиотики следующей природы: штамм INA 01085 образует гексаен с поглощением λ_{\max} (60% этанол) = 340, 362 и 385 нм, а штамм INA 01086 – пентаен с поглощением λ_{\max} (60% этанол) = 319, 336 и 355 нм. Очищенные сырцы обоих полиеновых антибиотиков проявляли активность в отношении грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 и *S. aureus* INA 0076 (MRSA), а также слабую активность в отношении *A. niger* INA 00760, но были неактивны в отношении штамма *E. coli* ATCC 25922.

Помимо полиенов у штаммов INA 01085 и INA 01086 выделены и исследованы два антибиотика пептидной природы с молекулярной массой 2059 и 1505 соответственно. В состав обоих антибиотиков входят аминокислоты

Asp, Gly, Leu, Pro, Tyr, Thr, Trp, Phe. У антибиотика, образуемого штаммом INA 01085, в отличие от штамма INA 01086 содержится 2 неидентифицированные небелковые аминокислоты. Оба антибиотика эффективны в отношении всех применявшихся грамположительных тест-бактерий, но не эффективны в отношении грамотрицательных микроорганизмов и грибов.

В культуральной жидкости на ранних сроках культивирования установлена антимикробная активность в отношении грамотрицательной тест-бактерии *E. coli* ATCC 25922. Выделенные антибиотики подобной активностью не обладают. Следовательно, оба штамма дополнительно образуют антибиотик, который присутствует в незначительном количестве (или легко разрушается), либо при применявшейся схеме выделения и очистки, основывавшейся на контроле биологической активности по отношению к тест-культуре *S. aureus* INA 0076 (MRSA), не проявляет активности и поэтому не был выделен [4].

Заключение

Поскольку среди бактерий, выделенных из базидиом, 77% изолятов образуют антибиотические вещества можно утверждать, что плодовые тела базидиальных грибов являются перспективным источником бактерий – продуцентов антибиотиков. Такая большая доля штаммов – продуцентов антибиотиков, предположительно, связана с природой базидиом, которые формируют биомассу на короткий период времени, или с быстротой размножения бактерий, успевающих колонизировать этот источник питательных веществ. При этом между бактериями, вероятно, возникает конкуренция, чем можно объяснить большое количество бактерий, выделяющих антибиотики.

Среди изученных штаммов относительно велика доля продуцентов антибиотиков, эффективных в отношении таких резистентных тест-штаммов, как *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177 (VRSA) (45,5, 29,4 и 7 % соответственно). При этом два выделенных штамма *B. subtilis* образуют, по меньшей мере, по три антибиотика каждый. Из них описанные пептидные антибиотики отличаются от известных пептидных антибиотиков, то есть относятся к новым природным соединениям. Различия в их составах сводятся к двум дополнительным небелковым аминокислотам у антибиотика из штамма INA 01085, что свидетельствует о вариабельности популяций *B. subtilis* по

данному признаку и высокой приспособляемости вида, в целом.

Эта информация еще раз подтверждает оценку *B. subtilis* как бактерии, у которой описано наибольшее число образуемых антибиотиков [8-14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. The Journal of Antibiotics. 2013. 66: 571-591.
2. Berdy J. Bioactive microbial metabolites: A personal view. The Journal of Antibiotics. 2005. 58:1-26.
3. Chin Y.-W., Balunas M.J., Chai H.B., Kinghorn A.D. Drug Discovery From Natural Sources. AAPS Journal. 2006. 8(2): 239–253.
4. Malanicheva I.A., Kozlov D.G., Efimenko T.A., Zenkova V.A., Katrukha G.S., Reznikova M.I., Korolev A.M., Borshchevskaya, Tarasova O.D., Sineokii S.P., Efremenkova O.V. New Antibiotics Produced by L. N. *Bacillus subtilis* Strains. Microbiology. 2014. 83(4): 352–356.
5. Bostian M., McNitt K., Aszalos A., Berdy J. Antibiotic identification: a computerized data base system . The Journal of Antibiotics. 1977. 30(7): 633–634.
6. Гаузе Г.Ф. Борьба за существование. Издательство: Институт компьютерных исследований. 2002: 160.
7. Howden B.P., Davies J.K., Johnson P.D.R., Timothy P. Stinear, M. Lindsay Grayson. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. Clinical Microbiology. Review. 2010. 23(1): 99-139.
8. Tamehiro N., Okamoto-Hosoya Y., Okamoto S., et al. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002. 46: 315–320.
9. Zimmerman S.B., Schwartz C.D., Monaghan R.L. et al. Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I. Production, taxonomy and antibacterial activity. The Journal of Antibiotics. 1987. 40: 1677–1681.
10. Wilson K.E., Flor J.E., Schwartz R.E. et al. Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. II. Isolation and physico-chemical characterization. The Journal of Antibiotics. 1987. 40:1682–1691.
11. Patel P.S., Huang S., Fisher S. et al. Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. The Journal of Antibiotics. 1995. 48: 997–1003.
12. Romero-Tabarez M., Jansen R., Sylla M. et al. 7-*O*-malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant Enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006. 50(5): 1701–1709.
13. Егоров Е.С., Баранова И.Н. Бактериоцины: Образование свойства, применение. Антибиотики и химиотерапия. 1999.6: 33–40.
14. Rea M. C., Ross R. P., Cotter P. D., Hill C. Classification of bacteriocins from gram-positive bacteria. Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Eds. Drider D., Rebuffat S. Springer Science+Business Media LLC. 2011: 29–53.

Поступила 31.07.2014

(Контактная информация: **Ефименко Татьяна Александровна** - аспирант, м.н.с. Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН; адрес: 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, дом 11; тел. 8909-633-01-25, 8(499) 255-77-31; E-mail: efimen@inbox.ru)