

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПО  
ИЗЫСКАНИЮ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ ИМЕНИ Г.Ф.ГАУЗЕ»

На правах рукописи

Куликова Нина Георгиевна

**РАЗРАБОТКА СЕЛЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ  
АКТИНОБАКТЕРИЙ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ  
АНТИБИОТИКОВ ИЗ РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ**

Специальность 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук,  
профессор Терехова Л.П.

Москва, 2017

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>5</b>
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>13</b>
1.1. Эндوفиты – микросимбионты растений .....	13
1.2. Селективные методы выделения эндوفитных актинобактерий из растительных тканей.....	18
1.3. Таксономическое разнообразие изолированных эндوفитных актинобактерий.....	21
1.4. Биологически активные соединения, продуцируемые эндوفитными актинобактериями .....	26
<b>Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>40</b>
2.1. Объекты исследования .....	40
2.2. Методы селективного выделения актинобактерий из почвы и растений ...	45
2.3. Количественный учет выделенных актинобактерий.....	47
2.4. Определение таксономического положения выделенных культур актинобактерий.....	47
2.5. Изучение антагонистических свойств выделенных культур актинобактерий .....	52
2.6. Статистическая обработка результатов исследований .....	53
<b>Глава 3. РАЗРАБОТКА НОВОГО СЕЛЕКТИВНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ АКТИНОБАКТЕРИЙ ИЗ ПОЧВЫ С ДОБАВЛЕНИЕМ БИОГЕННЫХ АМИНОВ.....</b>	<b>56</b>
3.1. Изучение влияния биогенных аминов на прорастание спор почвенных актинобактерий.....	57
3.2. Определение таксономического положения выделенных из почвы культур актинобактерий.....	59
3.3. Изучение антагонистических свойств почвенных актинобактерий .....	62
3.4. Описание редких культур актинобактерий, выделенных из почвы .....	65

<b>Глава 4. РАЗРАБОТКА НОВОГО СЕЛЕКТИВНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ЭНДОФИТНЫХ АКТИНОБАКТЕРИЙ ИЗ ЛИСТЬЕВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ</b> .....	<b>73</b>
4.1. Подбор условий выделения эндофитных актинобактерий.....	73
4.2. Определение таксономического положения выделенных актинобактерий-эндофитов.....	79
4.3. Изучение антагонистических свойств культур эндофитных актинобактерий, выделенных из листьев растений .....	82
4.4. Описание редких культур эндофитных актинобактерий.....	85
<b>Глава 5. ИНДУКЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ АНТИБИОТИКОВ ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ШТАММОВ РЕДКИХ РОДОВ АКТИНОБАКТЕРИЙ</b> .....	<b>88</b>
5.1. Условия глубинного культивирования отобранных культур актинобактерий .....	89
5.2. Подбор условий биосинтеза антибиотиков при глубинном культивировании актинобактерий.....	90
5.3. Индукция образования антибиотиков штаммами редких родов актинобактерий.....	94
<b>Глава 6. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗУЧЕНИЯ АКТИНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДВУХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ – ПОЧВЫ И ЛИСТЬЕВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ</b> .....	<b>96</b>
6.1. Сопоставление таксономического разнообразия актинобактерий почвы и растений.....	96
6.2. Сопоставление антибиотической активности актинобактерий почвы и растений.....	99
<b>ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ</b> .....	<b>101</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	<b>111</b>

<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>112</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>114</b>
<b>Приложение. СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД.....</b>	<b>142</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем современной медицины является быстро возникающая резистентность у патогенных микроорганизмов, вирусов и раковых клеток к применяемым лекарственным средствам. Ввиду этого большое значение имеет вопрос поиска новых эффективных антибиотиков, основным источником которых являются природные соединения, синтезируемые различными микроорганизмами – актинобактериями, немитозными бактериями и грибами. Среди микроорганизмов – продуцентов антибиотиков лидерами по числу, химическому разнообразию и механизму действия продуцируемых антибиотических веществ являются актинобактерии, которые синтезируют антибиотики с антибактериальным, противогрибковым, противовирусным, противопаразитарным и противоопухолевым действием [Гаузе, 1961; Егоров, 2005; Bérdy, 2005; Stackebrandt et al., 2006; Babalola et al., 2009; Igarashi et al., 2012; Kumar et al., 2013; Adegboye et al., 2012]. Помимо антибиотиков, актинобактерии способны продуцировать ингибиторы ферментов, иммуномодуляторы, токсины, гербициды и инсектициды, а также витамины, гормоны, антиоксиданты, энзимы, ростовые вещества и аминокислоты [Baltz, 2008; Alam et al., 2010; Adegboye et al., 2012]. Согласно последним исследованиям, есть все основания полагать, что возможности актинобактерий как продуцентов биологически активных веществ далеко не исчерпаны.

Одним из важных этапов поиска и разработки новых антибиотиков является выделение актинобактерий-продуцентов из природных мест обитания. Основным источником выделения актинобактерий является почва. Вместе с тем они распространены и в других, менее традиционных для выделения, экологических системах – пресной и морской воде, горячих источниках, ледниковых отложениях, а также в различных частях растений – корнях, листьях, стеблях и плодах [Macagnan et al., 2006; Khanna et al., 2011; Adegboye

et al., 2012]. Для выделения актинобактерий из природных источников применяются различные методы, как традиционные, так и селективные, которые основаны на изменении состава селективной среды или предварительной обработке образцов химическими, физическими и биологическими агентами. Приемы, применяющиеся в селективных методах изоляции микроорганизмов, позволяют увеличить таксономическое разнообразие культур прокариот, которые выделяются из исследуемого образца. Несмотря на обилие применяемых методов выделения, современные молекулярно-биологические подходы, которые основаны на метагеномном секвенировании природных образцов, показали, что в чистую культуру выделено менее 1% всего существующего микробного многообразия, в то время как оставшиеся некультивируемые формы могут быть потенциальными продуцентами антибиотиков с новыми механизмами биологического действия и химическими структурами [Bérdu, 2005; Davis et al., 2005; Baltz, 2008; Babalola et al., 2009; Alam et al., 2010; Kumar et al., 2010].

На основании вышеизложенного особое значение приобретает вопрос разработки новых методов выделения микроорганизмов, в том числе актинобактерий, которые способствовали бы более полному выявлению таксономического разнообразия в изучаемом микробиоценозе и выделению представителей редких, малоизученных и некультивируемых ранее родов. Более того, применение новых неординарных методов выделения наряду с изоляцией микроорганизмов из нетрадиционных экологических систем (не почвенных экосистем) может привести к выделению продуцентов антибиотиков с ценными свойствами для медицинского и биотехнологического применения.

### **Цель и задачи исследования**

*Цель* исследования состояла в разработке новых селективных методов выделения актинобактерий из различных экосистем – почвы и листьев

лекарственных растений, и поиска продуцентов антибиотических веществ среди выделенных культур.

Для достижения поставленной цели в процессе исследования решались следующие *экспериментальные задачи*:

1. Разработка нового селективного метода выделения актинобактерий из почв с применением биогенных аминов (биомедиаторов).
2. Разработка нового селективного метода выделения эндофитных актинобактерий из листьев лекарственных растений средней полосы России.
3. Изучение влияния биологически активных соединений – адреналина, гетероауксина и циркона на прорастание спор почвенных и эндофитных актинобактерий.
4. Определение таксономического положения выделенных культур на основании изучения фенотипических и геносистематических признаков.
5. Изучение антагонистических свойств выделенных культур и отбор штаммов, перспективных для изыскания новых антибиотических веществ.
6. Изучение влияния биогенных аминов на индукцию биосинтеза антибиотиков неактивными штаммами редких родов актинобактерий.
7. Сравнительный анализ полученных результатов изучения актинобактерий, выделенных из двух экологических систем – почвы и листьев лекарственных растений.

### **Научная новизна**

Разработан новый метод селективного выделения актинобактерий из почвы с добавлением в питательные среды биологически активных соединений – адреналина и гетероауксина. Показано, что добавление данных биомедиаторов в состав агаризованных питательных сред приводит к увеличению количества выделенных колоний актинобактерий по сравнению с контролем. Разработанный метод способствовал селективному выделению

культур актинобактерий, которые условно принято считать редко изолируемыми в сравнении с культурами рода *Streptomyces*, – *Micromonospora* spp., *Actinoplanes* spp., *Nonomuraea* spp. и *Catellatospora* spp. Добавление адреналина (1 мкг/мл) и гетероауксина (20 мкг/мл) в состав селективных сред способствовало выделению большего, по сравнению с контролем, количества штаммов актинобактерий, активных в отношении грамположительных, в том числе метициллинорезистентного стафилоккока (MRSA), и грамотрицательных тест-бактерий, а также дрожжеподобных грибов.

Впервые проведено направленное выделение эндофитных актинобактерий из лекарственных растений Российской Федерации. Для этого был разработан новый селективный метод изоляции актинобактерий-эндофитов из водной суспензии листьев растений, с применением гетероауксина и циркона для предобработки растительных тканей. Применение разработанного метода позволило изолировать эндофитные актинобактерии из всех исследуемых образцов растений, а также увеличить количество выделяемых культур эндофитных актинобактерий, в том числе культур *Micromonospora* spp. Впервые из лекарственных растений, произрастающих на территории России, были выделены редко изолируемые эндофитные штаммы рода *Nocardopsis*, относящиеся к видам: *N. umidischolae*, *N. viridoflava*, *N. tropica*, *N. quinghaiensis*, *N. exhalans* и *N. dasonvillei*. Предобработка листьев гетероауксином (20 мкг/мл) и цирконом (1 мкг/мл) позволила изолировать из листьев лекарственных растений большее количество антибиотически активных культур эндофитных актинобактерий в сравнении с контролем. Благодаря предобработке листьев указанными соединениями были выделены культуры, антибиотически активные в отношении грамотрицательных бактерий, в то время как в контроле таких культур выделено не было.

Впервые растворы биологически активных веществ адреналина и гетероауксина применялись как индукторы биосинтеза антибиотиков у культур редких родов актинобактерий. Показана возможность применения адреналина и гетероауксина в качестве ауторегуляторов антибиотикообразования у



некоторых культур редких родов актинобактерий при совместном культивировании.

### **Практическая значимость**

Разработаны селективные методы выделения актинобактерий из почвы и листьев растений, в результате применения которых получена возможность изолировать культуры редких родов актинобактерий, которые представляют перспективный источник получения антибиотиков с новыми химическими структурами и спектром биологического действия.

В результате проведенных исследований выделено 1500 штаммов почвенных и 120 штаммов эндофитных актинобактерий. Собрана большая коллекция культур, относящихся к редким родам актинобактерий, в том числе редко выделяющихся – *Catellatospora methionotrophica* и *Nocardiosis spp.*, которые могут служить объектами исследований в различных областях – для фундаментальных исследований и изыскания биологически активных веществ для медицинского и биотехнологического применения.

Применение разработанных селективных методов позволяет увеличить долю антибиотически активных штаммов актинобактерий, выделяемых из природных источников. Среди антибиотически активных культур актинобактерий, выделенных разработанными в данной работе методами, были выявлены штаммы, активные в отношении метициллинорезистентного стафилококка (MRSA), которые представляют наибольший интерес для дальнейших исследований в связи с возрастающей устойчивостью патогенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам, применяемым в клинике.

Показано, что внесение адреналина (1 мкг/мл) и гетероауксина (20 мкг/мл) в жидкие питательные среды индуцирует биосинтез антибиотиков у некоторых культур редких родов актинобактерий. Полученные результаты позволяют увеличить количество штаммов потенциальных продуцентов для изыскания антибиотиков с новыми свойствами.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Разработан новый метод селективной изоляции актинобактерий из почвы с добавлением в питательную среду адреналина и гетероауксина
2. Разработан новый метод селективного выделения эндофитных актинобактерий из листьев лекарственных растений средней полосы России с применением гетероауксина и циркона для предобработки растительных тканей.
3. Выявлено стимулирующее влияние биологически активных соединений – адреналина, гетероауксина и циркона на прорастание спор актинобактерий разных экосистем – почвы и листьев растений.
4. Показано индуцирующее действие адреналина и гетероауксина на биосинтез антибиотиков у штаммов редких родов актинобактерий, которые были выделены разработанными в представленной работе методами.

### **Личный вклад автора**

Аналитический обзор научно-методической литературы, посвященной проблематике работы; отбор образцов почв и сбор лекарственных растений для исследований; все экспериментальные научные исследования, изложенные в диссертации; анализ всех полученных результатов представленной исследовательской работы были выполнены автором самостоятельно под руководством д.б.н., профессора Тереховой Ларисы Петровны.

### **Апробация работы**

Основные положения работы были представлены на конференции студентов и молодых ученых МГУИЭ (Москва, 2010), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов. Прошлое, настоящее, будущее» (Москва, 2011), Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012), VII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и

перспективы развития» (Москва, 2013) (была награждена дипломом и медалью за лучшую научно-исследовательскую работу), международной конференции «Актуальные проблемы современной науки» (Варшава, 2013), XIII Съезде Общества микробиологов Украины им. С. В. Виноградского (Ялта, 2013) (была награждена дипломом за лучший устный доклад), XXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2015), V Юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2015), IV Международной конференции «Микробное разнообразие: ресурсный потенциал. ICOMID – 2016» (Москва, 2016) (была награждена дипломом победителя за лучший стендовый доклад).

Результаты диссертационной работы докладывались на заседаниях Ученого Совета, а также семинарах отдела микробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» (2010 – 2015 гг.).

### **Публикации**

По результатам исследования опубликовано 12 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации результатов диссертационных работ, 1 работа в зарубежном научном издании и 1 статья, включенная в базу Российского индекса научного цитирования (РИНЦ), которая опубликована в сборнике трудов международной конференции.

### **Объем работы**

Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 4-х глав результатов исследования, обсуждения полученных результатов, выводов, списка использованной литературы и приложения. Материалы диссертации изложены

на 145 страницах, содержат 15 таблиц и 17 рисунков. Список литературы включает 214 источников, в том числе 175 на иностранном языке.

### **Место проведения работы**

Работа выполнена в лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе».

### **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н., профессору Ларисе Петровне Тереховой за неоценимую помощь, ценные советы и всестороннюю поддержку при выполнении работы.

Глубокую признательность и благодарность автор выражает к.б.н. Ольге Владимировне Ефременковой за постоянное внимание к работе, критические замечания и ценные консультации, оказавшие значительное влияние на формирование научного мировоззрения автора. Особую благодарность автор выражает д.б.н. Вере Сергеевне Садыковой за внимание, объективные замечания и ценные рекомендации, которые позволили улучшить работу.

Автор выражает искреннюю благодарность коллегам за помощь, поддержку, дискуссии и ценные советы при выполнении отдельных разделов экспериментальной части работы: Т. Д. Иванковой, И. А. Маланичевой, Т. А. Ефименко, О. Н. Синевой, Е. А. Куракиной, Н. Д. Малкиной, О. П. Бычковой, С. Д. Долгоруковой, Е. Д. Турлянской, И. В. Белицкому.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Представленная диссертационная работа посвящена разработке новых методов селективного выделения из почвы и листьев растений актинобактерий – потенциальных продуцентов антибиотиков. Изучению почвенных актинобактерий посвящено много отечественных исследований, в которых подробно описаны существующие методы выделения и таксономическое разнообразие этих микроорганизмов [Гаузе, 1961; Терехова и др., 1989; Галатенко и др., 1990; Алферова, 1992; Булина, 1998; Зенова, 1998; Михайлова, 2000; Ли, 2003; Оборотов, 2007; Лысак, 2010; Курапова, 2011]. Направленное исследование эндофитных актинобактерий, которые колонизируют растения Российской Федерации, было проведено нами впервые. В связи с этим обзор литературы посвящен эндофитным актинобактериям – особенностям их распространения; свойствам, которыми они обладают; существующим селективным методам их выделения и биоразнообразию выделенных к настоящему времени актинобактерий-эндофитов. Последняя глава обзора литературы посвящена биологически активным веществам, полученным из культур эндофитных актинобактерий.

### 1.1. Эндофиты – микросимбионты растений

Одной из нетрадиционных экосистем для выделения потенциальных продуцентов антибиотиков являются высшие растения. Подавляющему большинству растений характерны симбиозы с микроорганизмами, синтезирующими компоненты минерального питания, которые растения не получают в процессе собственного биосинтеза [Тихонович и др., 2005]. К таким элементам относятся фитогормоны и другие компоненты, которые влияют на метаболизм, рост растения и на способность к фиксации микроэлементов (азота и фосфора). Микроорганизмы, которые населяют внутренние ткани высших растений и находятся с ними в мутуалистических или патогенных отношениях, в зависимости от условий окружающей среды и состояния растения-хозяина,

называются эндофитными [Saikkonen et al., 2004; Rosenblueth et al., 2006; Ryan et al., 2008; Staniek et al., 2008; Huang et al., 2012]. Растение обеспечивает эндофитные микроорганизмы питанием и стабильной средой обитания. В свою очередь, алкалоиды, ферменты и антибиотические вещества, которые выделяют эндофиты, защищают растение от насекомых-вредителей, нематод, придают устойчивость к растительным патогенам и неблагоприятным факторам окружающей среды, а также положительно влияют на ростовые свойства растения, так как являются биостимуляторами роста [Ryan et al., 2008; Huang et al., 2012].

Эндофитные микроорганизмы обитают в разных частях растения: корнях, стеблях, листьях, цветках, плодах и семенах, колонизируя, как правило, внутри- или межклеточное пространство внутренних тканей [Lee et al., 1995; Posada et al., 2005; Ryan et al., 2007; Miller et al., 2012; Gangwar et al., 2014]. Наиболее часто выделяемыми и наиболее изученными эндофитными микроорганизмами являются мицелиальные грибы и немиецелиальные бактерии [Strobel et al., 2003; Saikkonen et al., 2004; Staniek et al., 2008]. Помимо мицелиальных грибов и немиецелиальных бактерий из растений выделяют актинобактерии и дрожжеподобные грибы [Lee et al., 1995; Saikkonen et al., 2004; Gai et al., 2009; Krings et al., 2012]. Согласно данным литературы, эндофиты – организмы, которые живут по крайней мере одну фазу своей жизни внутри растений, имеют латентные и инкубационные периоды, что позволяет им колонизировать растение, не вызывая у них каких-либо «симптомов» [Zhang et al., 2006] и «не нанося им вреда» [Hallman et al., 1997].

Эндофиты попадают в растение путем вертикального распространения из почвы, ризосферы и ризоплана растений, а также через уже колонизированные плоды и семена растений [Viswanathan et al., 2003]. Эндофитные микроорганизмы могут также проникать в растение через устья или механические повреждения. Некоторые эндофиты могут вырабатывать специальные ферменты, которые помогают им проникать внутрь растения [Viswanathan et al., 2003].

Эндофитные клубеньковые бактерии играют важную роль в азотном питании растений и повышении плодородия почвы. Фиксация азота – способность некоторых эндофитов, одним из представителей которых является *Herbaspirillum* sp., который колонизирует внутренние ткани дикого риса [Elbeltagy et al., 2001]. Эта бактерия способна фиксировать азот с помощью ацетилена. Помимо *Herbaspirillum* sp. эндофитными азотфиксирующими бактериями дикого риса являются *Ideonella* sp., *Enterobacter* sp. и *Azospirillum* sp. У бактерии *Acetobacter diazotrophicus*, выделенной из внутренних тканей поверхностно стерилизованных корней, стеблей и листьев ананаса, была изучена способность фиксировать азот в растениях [Tapia-Hernández et al., 2000]. Результаты исследований показали, что более высокая частота встречаемости *A. diazotrophicus* была в почках, которые не насыщены азотом, и более низкая – внутри почки, ранее насыщенной азотом. Это указывает на то, что бактерии будут обогащать растение азотом в случае уменьшения его концентрации. Симбиоз растений с актинобактериями рода *Frankia* является одним из наиболее известных видов взаимовыгодного сожительства растений и клубеньковых микроорганизмов [Callahman, 1978]. Формирование данного симбиоза происходит путем проникновения актинобактерий в растение с образованием клубеньков, в которых затем локализуется доминантный микросимбионт и осуществляется процесс фиксации азота [Иванова Е.А., 2013]. Установлено, что кроме доминантных актинобактерий рода *Frankia*, в состав симбионтов растений входят и сопутствующие организмы – грибы везикулярно-арбускулярной микоризы и актинобактерии родов *Streptomyces* и *Nocardia*, которые способствуют проникновению доминантного симбионта рода *Frankia* в растение и формированию на его корнях клубеньков [Иванушкина и др., 1994].

Помимо фиксации азота эндофитные микроорганизмы способны синтезировать фитогормоны – индолил-3-уксусную кислоту, цитокинины и этилен, которые регулируют ростовые функции растений.

Индолил-3-уксусная кислота – гормон роста растений из группы ауксинов. Под его действием в растении интенсифицируется деление клеток, развивается сосудистая ткань, индуцируется образование корней, ингибируется потеря листьев, а также контролируется развитие плодов [Graham et al., 2003]. Было обнаружено, что продуцировать индолил-3-уксусную кислоту способны многие эндофиты: *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Azospirillum* sp., *Rhizobacter* sp., *Mezorhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp., *Brevibacterium* sp., *Bifidobacterium* sp., *Agrobacterium tumefaciens* [Long et al., 2008; Spaepen et al., 2007; Lodewyckx et al., 2002; Nimnoi et al., 2009]. Бактерии, синтезирующие индолил-3-уксусную кислоту внутри растений, оказывают воздействие на общий рост своего хозяина путем изменения уровня гормонов [Spaepen et al., 2007]. Так, эндофитная бактерия *Burkholderia kururiensis*, колонизирующая внутренние ткани растений, продуцирует индолил-3-уксусную кислоту внутри растения риса и, следовательно, имеет потенциал воздействия на его рост и урожайность [Mattos et al., 2008]. Индолил-3-уксусная кислота синтезируется бактериями разными метаболическими путями: индолил-3-ацетамидным, индол-3-пируватным, триптоминовым, триптофановым, индолил-3-ацетонитриловым и триптофанин независимым [Spaepen et al., 2007].

Другие фитогормоны, которые могут быть продуцированы эндофитами – цитокинины – соединения, которые влияют на рост корней и дифференцировку клеток, стимулируют деление, рост и прорастание клетки, а также замедляют процесс старения [Campbell et al., 1999]. Эти соединения называются цитокининами, потому что они инициируют этап цитокинеза клеточного цикла. Было установлено, что эндофитные бактерии *Methylobacterium extorquens* сосны обыкновенной способны косвенно продвигать синтез цитокининов, продуцируя производное аденина, которое используется в качестве предшественника окончательной формы гормона цитокинина [Pirttila et al., 2004].

Эндофитными микроорганизмами продуцируется еще один фитогормон – этилен, который индуцирует созревание плодов, вызывает старение листьев и



цветов, контролирует падение листьев, влияет на специализацию клеток и способен защитить растение-хозяина от патогенов [Graham et al., 2003]. Способность эндофитных бактерий влиять на физиологию растений обусловлено способностью к снижению уровня этилена в растениях посредством синтеза фермента 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АКК) дезаминазы [Hardoim et al., 2008]. К таким бактериям относятся различные виды рода *Burkholderia* [Onofre-Lemus et al., 2009].

Эндофитные микроорганизмы косвенно помогают растению-хозяину противостоять патогенам. Ранее было установлено, что эндофиты активны в отношении организмов, которые вызывают заболевания у растений. Например, *Delftia tsuruhatensis* HR4 – ростостимулирующая бактерия, подавляющая рост патогенов растений, таких как *Xanthomonas oryzae*, *Rhizoctonia solani* и *Pyricularia oryzae*. Эта бактерия также способна фиксировать азот [Han et al. 2005].

Эндофиты как эндосимбионты растений способны смягчать последствия экологического стресса: высоких температур, недостатка питательных веществ, воды, неблагоприятных условий и т.д. Эндофитные грибы могут придавать устойчивость к засухе, тяжелым металлам и болезням [Staniek et al., 2008]. Например, эндофитный гриб *Curvularia* sp., выделенный из растения семейства злаковых *Dichanthelium lanuginosum*, придает более широкий диапазон термотолерантности его хозяину по сравнению с растением без эндофита. Исследование с растениями *Dichanthelium lanuginosum* было проведено в геотермальных почвах – месте их естественного местообитания с целью выявления каких-либо эндофитных культур, которые способствуют выживанию их хозяев после теплового стресса. Исследования показали, что растения с эндофитными грибами выдерживали температуру до 65°C, в то время как растения без эндофитов начинали увядать уже при 50°C [Redman et al. 2002].

Эндофитные микроорганизмы считаются потенциальным источником получения новых веществ для медицинского применения благодаря их способности противостоять патогенным микроорганизмам; благодаря

способности эндофитных микроорганизмов осуществлять биологический контроль веществ растений-хозяинов [Cao et al., 2005], деградировать ксенобиотики [Strobel et al., 2003], разрушать органические соединения в растениях [Moore et al., 2006], ускорять рост [Igarashi et al., 2002] и придавать устойчивость растениям-хозяевам к тяжелым металлам [Ryan et al., 2007], а также способствовать выживанию растений в неблагоприятных условиях [Hasegawa et al., 2006], они считаются потенциальными продуцентами новых соединений для биотехнологической отрасли.

Таким образом, способность эндофитных микроорганизмов к синтезу биологически активных веществ различного химического строения и биологического действия делает их потенциальным источником новых веществ для медицинского и биотехнологического применения [Siciliano et al., 2001; Qin et al., 2011].

Следующие главы обзора литературы посвящены эндофитным актинобактериям, как одним из многообещающих продуцентов природных антибиотических соединений с новыми свойствами.

## **1.2. Селективные методы выделения эндофитных актинобактерий из растительных тканей**

Процесс селективного выделения эндофитных актинобактерий включает в себя несколько этапов: выбор растения для исследований, сбор образцов тканей растения, их поверхностная стерилизация и посев образцов на питательные среды.

По мнению Strobel'a и Daisy, для того, чтобы выделить новые биологически активные вещества, важно правильно выбрать растение для изоляции эндофитов. Авторы рекомендуют придерживаться двух критериев при выборе образцов для исследований: растение должно быть с уникальными экологическими особенностями – быть устойчивым к экологическим стрессам, тяжелым металлам, высоким температурам и т.д. Второй критерий выбора растения для выделения эндофитов заключается в том, что растение должно

иметь этноботаническую историю: например, применяться в лечебных целях, так как эндофитные актинобактерии способны придавать растению-хозяину лечебные свойства. Для выделения эндофитов могут также быть выбраны растения, которые имеют необычную долговечность или привезены из местообитаний с другим климатом. Для поиска новых продуцентов среди эндофитных культур стоит также обратить внимание на растения, которые растут в местах с большим разнообразием видов растений [Strobel et al., 2003].

Первым и самым важным шагом по выделению эндофитных актинобактерий является поверхностная стерилизация исследуемых тканей растения [Qin et al., 2011]. На этом этапе важно убить все эпифитные микроорганизмы с поверхности, для того чтобы они не проросли на селективной среде. Прежде чем приступить к стерилизации растительной ткани, ее предварительно очищают: собранные ткани растений тщательно моют в теплой проточной воде и промывают дистиллированной водой. Чаще всего применяют трехступенчатую стерилизацию, включающую в себя комбинированную систему обработки стерилизующими растворами в течение промежутка времени от 30 секунд до 20 минут. В качестве стерилизующих растворов обычно применяют этанол (70 – 99%), гипохлорит натрия (0,9 – 10%), Tween 20 и 80 (0,1%), Тритон X-100, хлорид ртути (0,01%) и перекись водорода (10 – 30%) [Bacon, 1988; Yue et al., 2000; Zinniel et al., 2002; Okazaki et al., 2003; Omarjee et al., 2004; Hallmann et al., 2006; Mendes et al., 2007; Bascom-Slack et al., 2009; Qin et al., 2009; Verma et al., 2009; Ahmed et al., 2012; Miller et al., 2012; Abdalla et al., 2014; Gangwar et al., 2014; Sulistiyani et al., 2014; Passari et al., 2015]. После обработки дезинфицирующими растворами образцы тщательно промывают стерильной дистиллированной водой. Для подавления вредного эффекта остаточного гипохлорита натрия Qin и соавторы предлагают ткани растения дополнительно обрабатывать тиосульфатом натрия [Qin et al., 2009]. Затем ткани могут быть обработаны в 10% растворе гидрокарбоната натрия для подавления роста эндофитных грибов [Nimnoi et al., 2010; Qin et al., 2011; Gangwar et al., 2014]. После каждого шага обработки образцов,

эффективность поверхностной стерилизации должна быть проверена на частоту стерилизации, для доказательства того, что выделенные культуры – истинные эндофиты [Strobel et al., 2003; Qin et al., 2009]. В целом, процедура поверхностной стерилизации должна быть оптимизирована для каждой растительной культуры, особенно время стерилизации – в зависимости от чувствительности ткани, вида, возраста и части растения требуется разное время обработки образцов.

Для увеличения количества выделяемых актинобактерий после поверхностной стерилизации и перед посевом на селективные среды Qin и соавторы предложили высушивать растительные образцы при 80°C или 100°C в течение 15 – 30 минут, чтобы убить эндофитные немиецелиальные бактерии [Qin et al., 2011]. Перед посевом на питательные среды образцы стерильно нарезают на маленькие фрагменты около 0,2×1,0 см [Coombs et al., 2003; Cao et al., 2004; Oliveira et al., 2010; Qin et al., 2011; Gangwar et al., 2012; Passari et al., 2015]. Для увеличения площади соприкосновения тканей растения с селективной средой Qin и Li с соавторами [Qin et al., 2008; Li, Zhao et al., 2009c] предложили измельчать образцы в блендере, а мягкую внутреннюю ткань растений растолочь в ступке с экстракционным раствором или буфером, после чего возможно делать многократное разведение образцов с последующим высевом на чашки Петри. Дополнительная предобработка исследуемых образцов может способствовать выделению большего количества культур редких родов актинобактерий [Qin et al., 2011].

Рост эндофитных актинобактерий *in vitro* зависит как от состава селективных сред, так и от условий культивирования. Для увеличения количества выделяемых эндофитных актинобактерий, в особенности редких родов, селективные среды должны содержать в своем составе источники нитратов – аминокислоты пролин, аргинин и аспарагин, и углерода – целлюлоза, ксилан, пропионат натрия и сукцинат натрия [Qin et al., 2009].

Резюмируя, можно сказать, что к настоящему времени накопилось много эффективных методик для селективного выделения и изучения

таксономического биоразнообразия эндофитных актинобактерий. Однако нельзя забывать о том, что несмотря на большое количество селективных методов к каждому исследуемому образцу растения нужно подходить индивидуально с учетом особенностей его тканей – твердые, мягкие, мясистые или тонкие – все свойства растения влияют на количество выделенных эндофитных актинобактерий – потенциальных продуцентов антибиотиков.

### **1.3. Таксономическое разнообразие изолированных эндофитных актинобактерий**

Из источников литературы известно, что эндофитные актинобактерии были выделены из зерновых культур (пшеницы, риса), овощей (картофеля, моркови, томата), различных деревьев, папоротников и плаунов, а также из лекарственных растений [Nejad et al., 2000; Araújo et al., 2002; Coombs et al., 2003; Taechowisan et al., 2003; Surette et al., 2003; Sessitsch et al., 2004; Tan et al., 2006; Tian et al., 2007; Zin et al., 2007; Velazquez et al., 2008; Yuan et al., 2008; Qin et al., 2008, 2009, 2011; Janso et al., 2010; Zhao et al., 2011]. Согласно источникам литературы, среди выделяемых эндофитных актинобактерий доминируют культуры рода *Streptomyces* [Qin et al., 2011; Gangwar et al., 2014; Passari et al., 2015]. Так например, Тан и соавторы выделили 619 штаммов актинобактерий из различных сортов томата, и все они принадлежали роду *Streptomyces* [Tan et al. 2006]. Кроме того, среди эндофитных актинобактерий, выделенных из различных частей растений, встречаются культуры новых видов рода *Streptomyces*: *S. alni* sp. nov., *S. artemisiae* sp. nov., *S. sedi* sp. nov. и *S. mayteni* sp. nov. [Chen et al., 2009a; Liu et al., 2009; Li et al., 2009a; Zhao et al., 2010]. Помимо рода *Streptomyces* выделяются культуры родов, которые принято условно считать редкими, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Microbispora* и *Streptoverticillium*, среди которых также были выделены новые виды: *Amycolatopsis endophytica* sp. nov., *Nocardia endophytica* sp. nov., *Nocardia callitridis* sp. nov. [Kaewkla et al., 2010a; Li et al., 2011; Miao et al., 2011; Xing et al., 2011].

Известно, что таксономическое распределение эндофитных актинобактерий в разных частях растения неоднородно. Так, по сравнению с листьями и стеблями корни обладают наибольшим таксономическим разнообразием эндофитных культур. Это подтверждается работой Sardi и соавторов (1992), в которой эндофитные актинобактерии выделяли из корней 28 разных растений, собранных на северо-западе Италии. В результате исследований было выделено 499 штаммов актинобактерий, большинство из которых принадлежало роду *Streptomyces* (482 штамма), остальные культуры принадлежали родам *Streptoverticillium*, *Nocardia*, *Micromonospora* и *Streptosporangium* [Sardi et al., 1992]. Lee и соавторы выделили 81 культуру эндофитных актинобактерий из корней китайской капусты, относящихся к 8 родам, из которых род *Streptomyces* был также доминирующим; многие выделенные культуры принадлежали родам *Micromonospora* и *Microbispora* [Lee et al., 2008]. Ученые Тайланда из 36 лекарственных растений выделили 330 штаммов актинобактерий, принадлежащих четырем различным родам: *Streptomyces*, *Microbispora*, *Nocardia* и *Micromonospora* [Taechowisan et al., 2003]. Культуры *Jishengella endophytica* sp. nov., *Leisonia ginseng* sp. nov., *Rothia endophytica* sp. nov. были впервые выделены из корней тропических растений, собранных на юге Китайской Народной Республики (КНР) [Qiu et al., 2007; Xie et al., 2011; Xiong et al., 2013], культура *Phytohabitans suffuscus* sp. nov. выделена из корней орхидеи, собранной в округе Окинава (Япония) [Inahashi et al., 2010].

По мнению Strobel'a и Daisy наибольшее биоразнообразие эндофитов находится в растениях тропических лесов, где густая растительность, оптимальная температура и обилие дождей способствует жизнедеятельности эндофитных микроорганизмов [Strobel et al., 2003]. Данная гипотеза подтверждается многочисленными исследованиями по поиску эндофитных актинобактерий, выделенных из тропических лесов. Следуя этой теории, Janso и Carter из тропических растений Папуа Новой Гвинеи, Мборокуа и Соломоновых островов выделили 123 штамма эндофитных актинобактерий.

Культуры эндофитов были выделены преимущественно из корней, в меньшей степени из листьев. Анализ последовательности генов 16S рРНК 105 культур редких родов показал, что они принадлежат 17 родам актинобактерий, в том числе родам *Sphaerisporangium* и *Planotetraspora* [Janso et al., 2010].

Группа ученых под руководством Qin, используя разнообразные методы предобработки и различные селективные среды, выделила 2174 культуры эндофитных актинобактерий из различных лекарственных растений провинции Хишуангбанна (КНР) [Qin et al., 2011]. Выделенные в результате исследований культуры были представлены десятью различными семействами – *Pseudonocardineae*, *Corynebacterineae*, *Streptomycineae*, *Frankineae*, *Micromonosporineae*, *Kineosporiineae*, *Micrococcaceae*, *Streptosporangineae*, *Propionibacterineae* и *Glycomycineae*; и 32 родами, в том числе редкими *Saccharopolyspora*, *Dietzia*, *Blastococcus*, *Dactylosporangium*, *Promicromonospora*, *Oerskovia*, *Actinocorallia* и *Jiangella*. Самым распространенным был род *Streptomyces* (87%). 280 штаммов принадлежали редким родам, среди которых преобладающим был род *Pseudonocardia* (87%). Были также выделены представители родов *Nocardiosis* (8,3%), *Micromonospora* (6,4%), *Streptosporangium* (3,8%) и других родов: *Kineosporia*, *Kineococcus*, *Herbidospora*, *Amycolatopsis*, *Lentzea*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Tsukamurella*, *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Janibacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nonomuraea* и *Glycomyces* [Qin et al., 2009].

Ученые из Юннаньского института микробиологии (КНР) выделили из 90 лекарственных растений, собранных в тропических лесах Хишуангбанна (КНР), культуры, относящиеся к 6-ти разным порядкам, 13 семействам и 24 родам эндофитных актинобактерий. Выделенные культуры принадлежали родам *Actinocorallia*, *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Curtobacterium*, *Dietzia*, *Glycomyces*, *Janibacter*, *Microbacteria*, *Micrococcus*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Nonomuraea*, *Oerskovia*, *Promicromonospora*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*, *Streptomycetoides* и *Streptosporangium* [Chen et al., 2007]. В том

числе из *Artemisia annua* (Полыни однолетней) – традиционного лекарственного растения Китая была впервые выделена культура *Pseudonocardia endophytica* [Chen et al., 2009b]. Также из тропических растений различных регионов были выделены еще 4 культуры новых видов рода *Pseudonocardia*: *P. eucalypti*, *P. adelaidensis*, *P. oroxyli*, *P. acaciae* [Gu et al., 2006; Duangmal et al., 2009; Kaewkla et al., 2010b, 2011a]. Из стебля лекарственного растения *Sambucus adnata* Wall. (Бузины адната) была впервые выделена культура *Glycomyces sambucus* [Gu et al., 2007].

Huang с коллегами выделили 280 эндофитных актинобактерий из 12 лекарственных растений, собранных в ботаническом саду Хайнан, КНР. Доминирующими были культуры рода *Streptomyces* – 249 штаммов (89%), 22 культуры (7,9%) принадлежали роду *Micromonospora* и 9 культур (3,1%) принадлежали родам *Nocardia*, *Nonomuraea* и *Amycolatopsis* [Huang et al., 2012].

Сао и соавторами проводилось выделение актинобактерий из здоровых и увядших тканей корней и листьев бананового дерева [Cao et al., 2004]. Результаты их исследований показали, что большинство выделенных актинобактерий принадлежало роду *Streptomyces* – 94,7% было выделено из здоровых листьев и 83,6% из увядших. Из здоровых тканей были выделены культуры 2-х редких родов *Streptoverticillium* (3,7%) и *Nocardia* (1,5%), а из увядших тканей были выделены представители родов *Actinomadura* (8,2%), *Streptoverticillium* (6,4%) и *Streptosporangium* (1,8%) [Cao et al., 2004]. Продолжив свои исследования с корнями бананового дерева, Сао с соавторами (2005) удалось выделить в общей сумме 131 штамм актинобактерий-эндофитов, большинство из которых по-прежнему принадлежало роду *Streptomyces* (99 штаммов). Помимо культур рода *Streptomyces* были выделены культуры родов *Streptoverticillium* (28 штаммов) и *Streptosporangium* (2 штамма) [Cao et al., 2005].

В своих исследованиях по увеличению количества артемизинина (artemisinin), продуцируемого травой *Artemisia annua* L. (Полынью однолетней) и обладающего противомаларийной активностью, Li с коллегами (2009)



выделили 50 штаммов эндосимбионтов полыни однолетней *A. annua* L., которые принадлежали родам *Streptomyces*, *Pseudonocardia*, *Micromonospora*, *Dactylosporangium*, *Sphaerisporangium*, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Kribbella*, *Gordonia* и *Nonomuraea* [Li et al., 2009b]. Кроме того, из *A. annua* L. был выделен и описан авторами новый вид *Nonomuraea endophytica* [Li et al., 2011], а из стеблей растения *Tripterygium wilfordii* (Триптеригиума Вильфорда), собранного в провинции Юннань (КНР), были впервые выделены культуры *Kineospora mesophila* и *Saccharopolyspora tripterygii* [Li et al., 2009c, 2009d]. Культура *Rhodococcus cercidiphylli* sp. nov. была выделена Li и соавторами из листьев растения *Cercidiphyllum japonicum* (Церцидифиллум японский), собранного в провинции Юннань (КНР) [Li et al., 2008]. Авторами описана еще одна культура нового вида актинобактерий – *Herbidospora osyris*, которая была выделена из растения семейства санталовых *Osyris wightiana* Wall. ex Wight в провинции Юннань (КНР) [Li et al., 2009e].

Бразильскими учеными было изучено 53 штамма эндофитных актинобактерий, 58,5% которых были выделены из листьев и 41,5% из корней кукурузы рода *Zea mays*. Растения были собраны на северо-востоке Бразилии в летний период. Результаты показали, что доминирующим был род *Micromonospora* (33 штамма), в то время как культур рода *Streptomyces* было выделено значительно меньше (6 штаммов), также были выделены представители рода *Streptosporangium* (4 штамма) [Araújo et al., 2000]. Их результаты совпали с результатами исследований Matsumoto (1998), в которых доминирующим родом также был род *Micromonospora* (44%) [Matsumoto et al., 1998].

При помощи полифазных таксономических подходов было выделено более 40 новых таксонов, включая 4 новых рода *Plantactinospora*, *Actinophytocola*, *Phytohabitans* и *Jishengella*. Большинство из выделенных штаммов имеют более 97% сходства, основанное на анализе последовательностей генов 16S рРНК с близкими неэндофитными родами. Это говорит о том, что некоторые эндофитные культуры очень схожи с

почвенными. Считается, что эндофитная популяция – это подмножество ризосферных микроорганизмов почвенного типа [Conn et al., 2004; Staniek et al., 2008; Compant et al., 2010]. Из листьев австралийского абрикосового дерева *Pittosporum phylliraeoides* была впервые выделена культура нового вида *Actinopolymorpha pittospori* [Kaewkla et al., 2011b], а из корней Тайландского риса были выделены культуры ранее некультивируемых видов *Actinophytocola oryzae* и *Actinoallomurus oryzae* [Indananda et al., 2010, 2011]. Культура нового вида *A. acaciae* была изолирована из корней акации ушковидной *Acacia auriculiformis* [Thamchaipenet et al., 2010]. Из стебля растения тропических лесов *Jatropha curcas* L. (Ятрофа куркас) впервые была выделена культура *Jatrophihabitans endophyticus* [Madhaiyan et al., 2013]. Некультивируемая ранее культура *Nocardioides caricicola* была выделена из галофитного растения *Carex scabrifolia* Steud. (Осока шероховатолистная), собранного на песчаных дюнах острова Намхае (Namhae Island) (Корея) [Song et al., 2011].

Таким образом, опираясь на данные литературы, можно утверждать, что растения являются многообещающим ресурсом для выделения культур новых и редких видов актинобактерий – потенциальных продуцентов новых антибиотических веществ. Это подтверждается многочисленными исследованиями и разнообразием новых биологически активных веществ с различными химическими структурами и механизмами биологического действия, полученными из выделенных актинобактерий [Strobel et al., 2006; Qin et al., 2011; Ambrose et al., 2013]. Многообразие родов и количество выделенных культур во многом зависит не только от методов выделения, но и от места взятия проб и вида изучаемых растений [Strobel et al., 2003; Qin et al., 2011].

#### **1.4. Биологически активные соединения, продуцируемые эндофитными актинобактериями**

В последние годы большое внимание уделяется изучению эндофитных микроорганизмов как потенциальных продуцентов новых антибиотически и

биологически активных веществ [Strobel et al., 2003; Abdalla et al., 2014; Tanvir et al., 2014; Golinska et al., 2015]. Несмотря на то, что многие эндофитные культуры являются продуцентами уже известных на сегодняшний день антибиотиков, среди них часто выделяются культуры, которые продуцируют вещества с новыми химическими структурами и различным биологическим действием. В данном разделе мы привели некоторые биологически активные соединения, продуцентами которых являются эндофитные актинобактерии, выделенные из разных растений.

Эндофитные актинобактерии, особенно из лекарственных растений, обладают способностью ингибировать рост или вызывать гибель патогенных бактерий, грибов, вирусов и раковых клеток [Guo et al., 2008; Gangwar et al., 2012; Zhou et al., 2014]. Известные на сегодняшний день антибиотические вещества, продуцируемые актинобактериями-эндофитами, приведены в таблице 1.

Стоит отметить, что продуцентами большинства новых антибиотических веществ, выделенных из эндофитных актинобактерий, являются культуры рода *Streptomyces*. Так, группа пептидных антибиотиков широкого спектра действия мунумбицины (munumbicins) выделена из эндофитных актинобактерий рода *Streptomyces* – *S. sp.* NRRL 30566 и *S. sp.* NRRL 30562. Культуры продуцентов были выделены из лекарственного растения *Kennedia nigricans* (Кеннедия черная). Семейство мунумбицинов включает 6 антибиотиков широкого спектра действия: мунумбицины А-D и мунумбицины Е-4 и Е-5 (таблица 1). Мунумбицины А-D синтезируются культурой *Streptomyces sp.* NRRL 30562, а мунумбицины Е-4 и Е-5 – *S. sp.* NRRL 30566 [Castillo et al., 2002; Castillo et al., 2006]. Все представители семейства мунумбицинов активны в отношении грамположительных бактерий, таких как *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus*, включая метициллинорезистентный штамм *S. aureus* (MRSA, ATCC 33591) и ванкомицинорезистентный штамм *E. faecalis* (VREF, ATCC 51299). Мунумбицин В активен в отношении лекарственно-устойчивого *Mycobacterium*

Таблица 1. Антибиотические вещества, продуцируемые актинобактериями-эндофитами.

№ п/п	Активное вещество		Активность	Продуцент	Растение-хозяин	Источник
1.	Мунумбицины А-D	Munumbicins A-D	широкий спектр действия	<i>Streptomyces</i> NRRL 30562	<i>Kennedia nigricans</i>	Castillo et al., 2002
2.	Мунумбицины Е-4, Е-5	Munumbicins E-4, E-5	широкий спектр действия	<i>Streptomyces</i> NRRL 30562	<i>Kennedia nigricans</i>	Castillo et al., 2006
3.	Саадамицины	Saadamycin	противогрибковая	<i>Streptosporangium oxazolinicum</i> sp. nov. K07-0460	<i>Orchid</i>	El-Gendy et al., 2010
4.	Коронамицины	Coronamycins	противогрибковая, противопротозойная ( <i>Plasmodium falciparum</i> )	<i>Streptomyces</i> sp. MSU-2110	<i>Monstera</i> sp.	Ezra et al., 2004
5.	6-пренилиндол	6-prenylindole	противогрибковая	<i>Streptomyces</i> sp. TP- A0595	<i>Allium tuberosum</i>	Ambrose et al., 2013
6.	Цедармицины А-В	Cedarmycins A-B	противогрибковая	<i>Streptomyces</i> sp. TP- A0456	<i>Cryptomeria japonica</i>	Ambrose et al., 2013
7.	Актиномицин D	Actinomycin D	противогрибковая	<i>Streptomyces</i> sp. Tc022	<i>Alpinia galanga</i>	Taechowisan et al., 2006
8.	Ксиамицин А	Xiamycin A	избирательная активность в отношении ВИЧ	<i>Streptomyces</i> sp. GT 2002/1503	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	Ding et al., 2010
9.	Ксиамицин В	Xiamycin B	антибактериальная, включая MRSA и VREF	<i>Streptomyces</i> sp. HKI0595	<i>Kandelia candel</i>	Ambrose et al., 2013

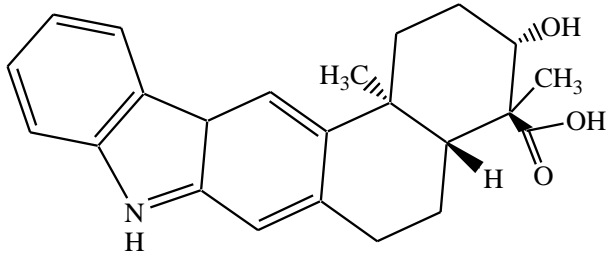
Таблица 1. Продолжение

№ п/п	Активное вещество		Активность	Продуцент	Растение-хозяин	Источник
10.	Индосеспин	Indosespene	антибактериальная, включая MRSA и VREF	<i>Streptomyces</i> sp. НК10595	<i>Kandelia candel</i>	Ambrose et al., 2013
11.	Сеспенин	Sespenin	антибактериальная, включая MRSA и VREF	<i>Streptomyces</i> sp. НК10595	<i>Kandelia candel</i>	Ambrose et al., 2013
12.	Перлолирин	perlolyrine	противовирусная	<i>Jishengella endophytica</i>	<i>Xylocarpus granatum</i>	Wang et al., 2014; Golinska et al., 2015
13.	1-гидрокси-β-карболин	1-hydroxy-β-carboline	противовирусная	<i>Jishengella endophytica</i>	<i>Xylocarpus granatum</i>	Wang et al., 2014; Golinska et al., 2015
14.	Люмихром	lumichrome	противовирусная	<i>Jishengella endophytica</i>	<i>Xylocarpus granatum</i>	Wang et al., 2014; Golinska et al., 2015
15.	1H-индол-карбоксалдексид	1H-indole-3-carboxaldehyde	противовирусная	<i>Jishengella endophytica</i>	<i>Xylocarpus granatum</i>	Wang et al., 2014; Golinska et al., 2015

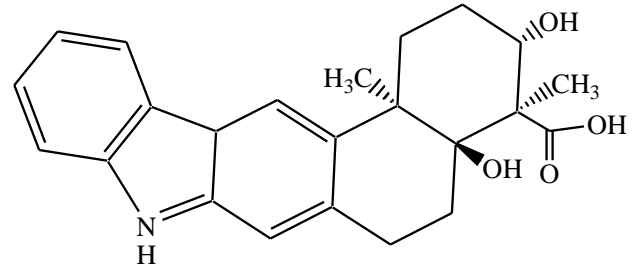
*tuberculosis* (MDR). Мунумбицины А и D наряду с активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий активны также в отношении возбудителя малярии *Plasmodium falciparum*, концентрация полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>) которых равна 4,5 мкг/мл [Ambrose et al., 2013]. Другой пептидный антибиотик саадамицин (saadamycin), обладающий значительной активностью в отношении дерматофитов и других клинических грибов, синтезируется эндофитной актинобактерией *Streptomyces* sp. Hedaya48 (таблица 1) [El-Gendy et al., 2010]. Эндофитным штаммом *Streptomyces* sp. MSU-2110, выделенного из растения *Monstera* sp. (Монстера), продуцируется группа пептидных антибиотиков коронамицинов (coronamycins) (таблица 1). Коронамицины ингибируют рост грибов, а также обладают активностью в отношении возбудителя малярии *P. falciparum* [Ezra et al., 2004].

Противогрибковое алкалоидное соединение, активное в отношении патогенного гриба *Fusarium oxysporum*, б-пренилиндол (6-prenylindole) (рисунок 1) было выделено из культуральной жидкости эндофитного штамма *Streptomyces* sp. TP-A0595, а из эндофитного штамма *Streptomyces* sp. TP-A0456 были получены два новых бутиролактона – cedarмицины А и В (cedarmycins А, В) (рисунок 1; таблица 1), которые активны в отношении грибных патогенов *Candida glabrata* с минимальной подавляющей концентрацией (МПК) равной 0,4 мкМ. Культура *Streptomyces* sp. TP-A0456 была выделена из ветки кедра *Cryptomeria japonica* [Ambrose et al., 2013]. Выделенная из корней *Alpinia galanga* (Альпиния галанга, или Калган галанга, или Калган большой) культура *Streptomyces* sp. Tc022 сильно ингибировала рост *C. albicans* и *Colletotrichum musae*. Основным компонентом экстракта культуральной жидкости *Streptomyces* sp. Tc022 является актиномицин D (actinomycin D) – соединение полипептидной природы (таблица 1; рисунок 1) [Taechowisan et al., 2006].

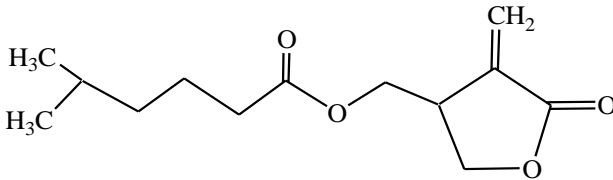
Высокой активностью по отношению к некоторым патогенным бактериям, включая метициллинорезистентный штамм *S. aureus* (MRSA) и ванкомицинорезистентный штамм *E. faecalis* (VREF), обладают вещества группы ксиамицина – ксиамицин В (xiamycin В), индосеспин (indosespene) и



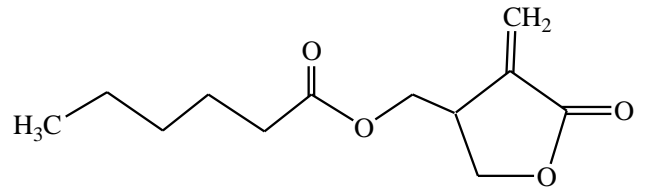
Ксиамицин А (Xiamycin A)



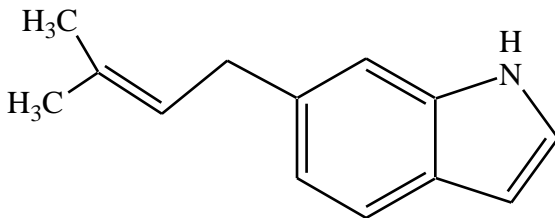
Ксиамицин В (Xiamycin B)



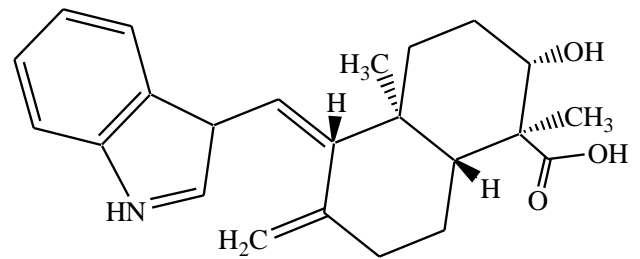
Цедармицин А (Cedarmycin A)



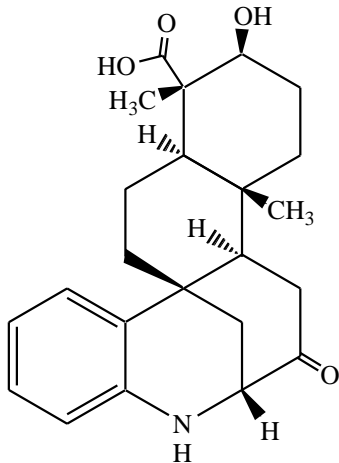
Цедармицин В (Cedarmycin B)



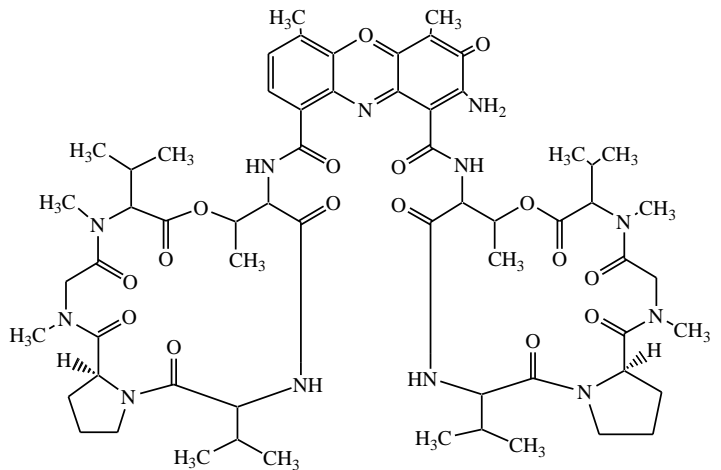
6-пренилиндол (6 – prenylindole)



Индосеспин (Indosespene)



Сеспенин (Sespenin)



Актиномицин D (Actinomycin D)

Рисунок 1. Структурные формулы некоторых антибиотиков, образуемых эндофитными актинобактериями.

сеспенин (sespenin) (таблица 1; рисунок 1) [Ambrose et al., 2013]. Продукентом вышеперечисленных веществ является культура *Streptomyces* sp. НК10595 – эндофит мангрового дерева *Kandelia candel*. Соединение ксиамицина А (xiamycin A) образуется культурой *Streptomyces* sp. GT 2002/1503, выделенной из растения *Bruguiera gymnorhiza* (Бругиера голокорневой) (таблица 1; рисунок 1). Антибиотик обладает избирательной активностью в отношении вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [Ding et al., 2010].

Антибиотически активные соединения перлолирина (perlolyrine), 1-гидрокси-β-карболин (1-hydroxy-β-carboline), люмихром (lumichrome), 1H-индол-карбоксалдексид (1H-indole-3-carboxaldehyde) были получены из культуры редкого рода актинобактерий *Jishengella endophytica*, выделенной из мангрового растения *Xylocarpus granatum* (таблица 1). Авторы выявили умеренную активность этих веществ в отношении вируса гриппа типа А подтипа H1N1 с IC<sub>50</sub> равной 38,3, 25,0, 39,7 и 45,9 мкг/мл соответственно. По предположениям Wang и соавторов 1-гидрокси-β-карболин является новым потенциальным лекарством от вируса H1N1 [Wang et al., 2014; Golinska et al., 2015].

Помимо антибактериальных, противогрибных и противовирусных антибиотиков из эндофитных актинобактерий рода *Streptomyces* выделены противоопухолевые соединения (таблица 2). Например, из актинобактерии рода *Streptomyces* sp. NRRL30566 – эндофита листьев папоротника *Grevillea pteridifolia*, были получены пептидные антибиотики какадумицины (kakadumicins), которые способны ингибировать рост раковых клеток легких линии BT20 с IC<sub>50</sub> равной 4,5 мкг/мл [Castillo et al., 2003]. Помимо этого какадумицины имеют схожую с мунумбицинами активность широкого спектра действия в отношении *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumonia*, *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus*, включая метициллинорезистентный штамм *S. aureus* (MRSA, ATCC 33591) и ванкомицинорезистентный штамм *E. faecalis* (VREF, ATCC 51299), а также по отношению к *Mycobacterium tuberculosis* и *Plasmodium falciparum* [Golinska et al., 2015].



Таблица 2. Противоопухолевые соединения из актинобактерий-эндофитов.

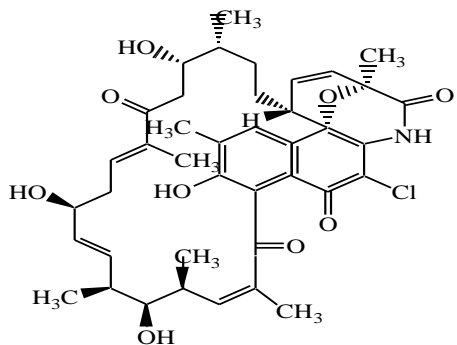
№ п/п	Активное вещество		Активность	Продуцент	Растение-хозяин	Источник
1.	Какадумицины	Kakadumycins	противоопухолевая, широкий спектр антибактериального действия,	<i>Streptomyces</i> sp. NRRL 30566	<i>Grevillea pteridifolia</i>	Castillo et al., 2003
2.	24-диметилбафиломицин С1	24-demethylbafilomycin С1	противоопухолевая	<i>Streptomyces</i> sp. CS	<i>Maytenus hookeri</i>	Zhao et al., 2005
3.	Нафтомицин К	Naphthomycin К	противоопухолевая	<i>Streptomyces</i> sp. CS	<i>Maytenus hookeri</i>	Lu et al., 2003; Lu et al., 2007
4.	Димерный динактин	Dimeric dinactin	противоопухолевая	<i>Streptomyces</i> sp. ls913	<i>Maytenus hookeri</i>	Lu et al., 2004
5.	Димерный нонактин	Dimeric nonactin	противоопухолевая	<i>Streptomyces</i> sp. ls913	<i>Maytenus hookeri</i>	Lu et al., 2004
6.	Лансаи	Lansai A-D	противоопухолевая, противовоспалительная	<i>Streptomyces</i> sp. SUC1	<i>Ficus benjamina</i>	Tuntiwachwuttikul et al., 2008; Taechowisana et al., 2009
7.	3'-диметилдигидромалдоксин	3'-demethyldihydromaldoxin	противоопухолевая, противовоспалительная	<i>Steganospora</i> sp. IBWFE07110	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Schreiber et al., 2012
8.	Дигидромалдоксин	Dihydromaldoxin	противоопухолевая, противовоспалительная	<i>Steganospora</i> sp. IBWFE07110	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Schreiber et al., 2012
9.	Салацеины А и В	Salaceyins А и В	противоопухолевая	<i>Streptomyces laceyi</i> MS53	<i>Ricinus communis</i> L.	Taechowisan et al., 2007b
10.	Птероцидин	Pterocidin	противоопухолевая	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> TP-A045	<i>Pteridium aquilinum</i>	Kim et al., 2006

Таблица 2. Продолжение

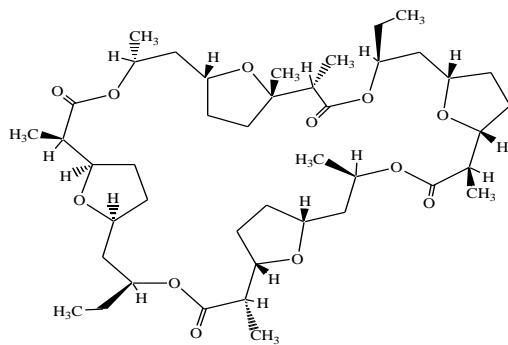
№ п/п	Активное вещество		Активность	Продуцент	Растение-хозяин	Источник
11.	Циклогексимид	Cycloheximide	противоопухолевая	<i>Streptomyces</i> sp. YIM56132	<i>Carex baccaus</i>	Igarashi et al., 2006; Huang et al., 2011
12.	Изо-циклогексимид	Iso-cycloheximide	противоопухолевая	<i>Streptomyces</i> sp. YIM56141	<i>Carex baccaus</i>	Igarashi et al., 2006
13.	Секоциклогексимиды А, В	Secocycloheximide А, В	противоопухолевая	<i>Streptomyces</i> sp. YIM56132	<i>Carex baccaus</i>	Igarashi et al., 2006
14.	5,7-диметокси-4-фенилкумарин	5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin	противоопухолевая, противофунгицидная, противовоспалительная	<i>Streptomyces aureofaciens</i> CMUAc130	<i>Zingiber officinale Rosc.</i>	Yu et al.,2011; Taechowisan et al., 2005; Taechowisan et al., 2007a
15.	5,7-диметокси-4-п-метоксилфенилкумарин	5,7-dimethoxy-4-p-methoxylphenylcoumarin	противоопухолевая, противофунгицидная, противовоспалительная	<i>Streptomyces aureofaciens</i> CMUAc130	<i>Zingiber officinale Rosc.</i>	Yu et al.,2011; Taechowisan et al., 2005; Taechowisan et al., 2007a

Известно, что представители рода *Streptomyces* являются продуцентами макролидных соединений семейства бафиломицина (bafilomycins) (таблица 2). Из культуры *Streptomyces* sp. YIM56209, выделенной из здоровых стеблей растения *Drymaria cordata*, получены 11 макролидных антибиотиков этого семейства, обладающих противоопухолевой, антимикробной и противогрибковой активностью, а также антипаразитическим и иммунодепрессантным действием [Li et al., 2010]. Эндофитной культурой *Streptomyces* sp. CS образуются новые производные бафиломицина: 24-диметилбафиломицин C1 (24 – demethylbafilomycin C1) и пять новых 16-членных бафиломицинов, показывающих цитотоксическую активность *in vitro* в отношении клеточных линий MDA-MB-435 [Zhao et al., 2005; Li et al., 2010]. Помимо соединений семейства бафиломицина культурой *Streptomyces* sp. CS, выделенной из лекарственного растения *Maytenus hookeri* (Майтенус Гукера), синтезируется хлорсодержащее соединение из группы ансамицинов – нафтомицин К (naphthomycin K) (таблица 2; рисунок 2). Нафтомицин К обладает цитотоксической активностью в отношении клеточных линий P388 и A-549 в  $IC_{50}$  равной 0,07 и 3,17 мкМ соответственно [Lu et al., 2003, 2004]. Из культуры *Streptomyces* sp. ls9131, которая также была выделена из *Maytenus hookeri*, было получено два новых макротетролида – димерный динактин (dimeric dinactin) (таблица 2; рисунок 2) и димерный нонактин (dimeric nonactin) (таблица 2; рисунок 2). Результаты анализа биологической активности показали, что димерный динактин обладает высокой противоопухолевой и антибактериальной активностью [Lu et al., 2007].

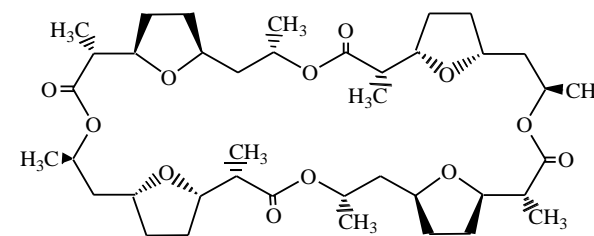
Группа биологически активных веществ лансаи А-Д (lansai A-D) (таблица 2; рисунок 2) синтезируется эндофитным штаммом *Streptomyces* sp. SUC1, который выделен из фикуса *Ficus benjamina* (Фикуса Бенджамина). Лансаи В показал слабую активность в отношении клеточной линии BC ( $IC_{50}$  = 15,03 мкг/мл), лансаи С показал значительную противовоспалительную активность в LPS- индуцированных RAW 264.7 клеток [Tuntiwachwuttikul et al., 2008;



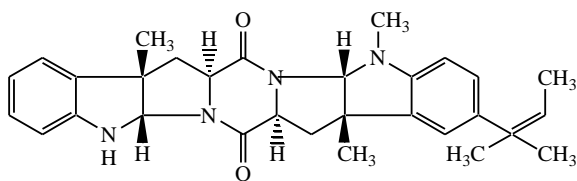
Нафтомицин К (Naphthomycin K)



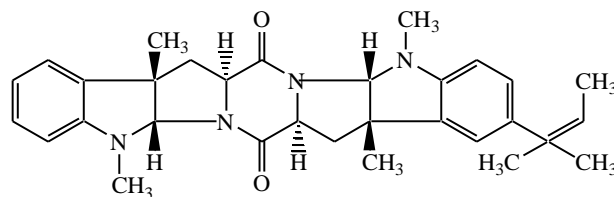
Димерный динактин (Dimeric dinactin)



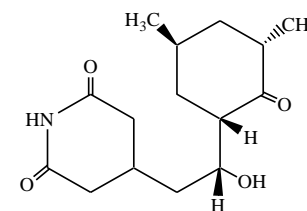
Димерный нонактин (Dimeric nonactin)



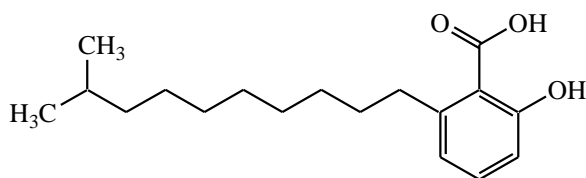
Лансаи А (Lansai A)



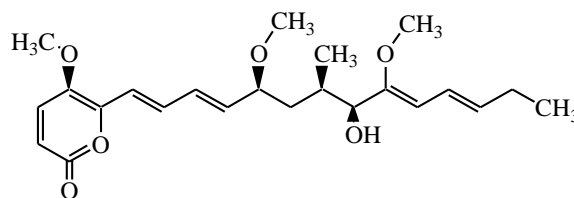
Лансаи В (Lansai B)



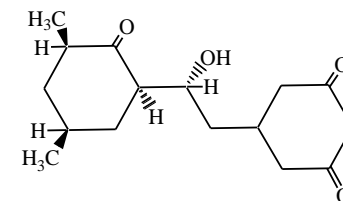
Циклогексимид (Cycloheximide)



Салацеин А (Salaceyin A)



Птероцидин (Pterocidin)



Изо-циклогексимид (Iso-cycloheximide)

Рисунок 2. Структурные формулы некоторых противоопухолевых антибиотиков, образуемых актинобактериями-эндофитами.

Taechowisana et al., 2009]. Два соединения диарил-эфиров – 3'-диметилдигидромалдоксин (3'-demethyldihydro-maldoxin) и дигидромалдоксин (dihydromaldoxin), образуются культурой *Steganospora* sp. IBWFE07110, выделенной из веток растения *Robinia pseudoacacia* (Робинии ложноакациевая), собранных в Германии (таблица 2). Эти соединения препятствуют активации связывания факторов транскрипции с регуляторными сайтами гена [Schreiber et al., 2012].

Соединения 6-алкилсалициловых кислот (6-alkalysalicylic acids) – салацеины А и В (Salaceyins А и В) обладают цитотоксичностью в отношении линии клеток рака молочной железы человека SKBR3 при значениях  $IC_{50}$  равной 3,0 и 5,5 мкМ соответственно (таблица 2; рисунок 2). Продуцентом салацеинов является культура *Streptomyces laceyi* MS53 [Taechowisan et al, 2007a].

Из эндофитной актинобактерии *Streptomyces hygroscopicus* TP-A045, изолированного из растения *Pteridium aquilinum* (Орляк обыкновенный), был выделен птероцидин (pterocidin) – соединение с цитотоксичностью в отношении клеточных линий рака человека NCI-H522, OVCAR-3, SF539 и LOX-IMVI с  $IC_{50}$  равными 2,9, 3,9, 5,0 и 7,1 мкМ соответственно (таблица 2; рисунок 2) [Kim et al., 2006; Igarashi et al, 2006; Golinska et al., 2015]. Igarashi и соавторами были получены два антибиотических вещества циклогексимид (cycloheximide) и изо-циклогексимид (iso-cycloheximide) (таблица 2; рисунок 2), а также их производные секоциклогексимиды А и В (secocycloheximide А, В) (таблица 2; рисунок 2), которые обладают цитотоксическими свойствами и ингибируют синтез белка в клетках. Продуцентом вышеперечисленных веществ являются эндофитные актинобактерии *Streptomyces* sp. YIM56132 и YIM56141 [Igarashi et al., 2006; Huang et al., 2011].

Противоопухолевую активность в отношении клеток рака легких показали соединения семейства арилкумаринов (arylocoumarins) 5,7-диметокси-4-фенилкумарин (5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin) и 5,7-диметокси-4-п-метоксилфенилкумарин (5,7-dimethoxy-4-*p*-methoxyphenylcoumarin), которые

синтезируются эндофитным штаммом *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 (таблица 2) [Yu et al., 2011; Taechowisan et al., 2005; Taechowisan et al., 2007b]. Авторами отмечается, что 5,7-диметокси-4-фенилкумарин может предотвращать или замедлять образование метастаз, а все соединения арилкумаринов из-за их низкой токсичности по отношению к здоровым клеткам могут применяться для химиопрофилактики в лечении рака [Taechowisan et al., 2007b; Golinska et al., 2015].

Помимо антибиотических веществ эндофитные актинобактерии способны синтезировать соединения, обладающие противодиабетическими свойствами. Так, например, из растений *Tinospora crispa*, *Caesalpinia sappans* и *Curcuma aeruginosa* Pujiyanto и соавторами было выделено 65 культур эндофитов, 12 из которых продуцировали вещества, ингибирующие альфа-глюкозидазы. Гипогликемические свойства, полученных соединений замедляли распад сложных углеводов, задерживая всасывание глюкозы в мышечные и жировые клетки [Pujiyanto et al., 2012]. Akshatha и соавторами были выделены ингибиторы альфа-амилазы из эндофитных актинобактерий *Streptomyces* sp. и *S. longisporoflavus*, которые были изолированы из противодиабетических лекарственных растений *Leucas ciliata* и *Rauwolfia densiflora* [Akshatha et al., 2014]. Полученные ингибиторы альфа-амилазы показали гипогликемическую активность, аналогичную ингибиторам альфа-глюкозидазы – они улучшали расщепление поли- и олигосахаридов, уменьшая образование и всасывание глюкозы в кишечнике [Golinska et al., 2015].

Эндофитные актинобактерии являются продуцентами веществ, обладающих антиоксидантными свойствами. Одними из природных антиоксидантных средств считаются фенольные соединения, обеспечивающие очистку организма от вредных свободных радикалов. Zhou и соавторами из штамма *Streptomyces* sp. – эндофита имбирного растения *Alpinia oxyphylla*, были получены 2 соединения с антиоксидантной активностью – 2,6-диметокси терефталевой кислоты (2,6-dimethoxy terephthalic acid) и йангинхуалин А (yangjinhualine A) [Zhou et al., 2013, 2014; Golinska et al., 2015].

Анализируя данные научной литературы, можно с уверенностью сказать, что эндофитные актинобактерии представляют собой богатый и далеко еще не полностью изученный источник продуцентов новых природных биологически активных соединений с различными химическими структурами и разнообразным спектром биологического действия, которые могут найти применение в фармацевтической и биотехнологической отрасли. Однако, для исследований по изысканию новых антибиотиков необходимы штаммы актинобактерий, выделенные в чистую культуру. Ввиду этого возникает задача разработки новых селективных методов, которые способствовали бы увеличению количества актинобактерий, изолируемых из природных местообитаний, и выделению большего количества продуцентов антибиотических веществ.

.

## Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

#### 2.1.1. Характеристика образцов почвы и лекарственных растений

Выделение актинобактерий из разных экологических систем проводилось из образцов почвы Раменского и Озерского районов Московской области (таблица 3) и листьев 20-ти лекарственных растений (таблица 4) Московского региона. Образцы почв были отобраны в летне-осенний период из верхних горизонтов почв, под разнообразной растительностью; сбор образцов листьев производился в весенне-летний период, выделение актинобактерий из листьев растений проводили непосредственно в день сбора или в течение ближайших 2 – 3 дней.

#### 2.1.2. Характеристика селективных агентов

В качестве селективных агентов были использованы биологически активные соединения: циркон, адrenaлин и гетероауксин.

Циркон – препарат, который получают в виде спиртового раствора (0,1 мг/мл) из растения Эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea*). Основным действующим веществом препарата является смесь гидроксикоричных кислот (0,1 г/л). Циркон активизирует ростовые процессы у растений, обладает сильным фунгицидным и антистрессовым действием. В работе использовали препарат под торговым названием «Циркон» (ННПП «НЭСТ М», Россия).

Адрenaлин – биогенный амин (биомедиатор), который участвует в распространении возбуждения в виде электрического сигнала, играя роль химического посредника между клетками в синапсах животных. Был обнаружен также в растениях и микроорганизмах – организмах, лишенных развитой нервной системы. В клетках растений и микроорганизмов регулирует метаболические и энергетические процессы, способствуя адаптации организма к изменениям окружающей среды [Рощина, 2010]. В работе использовали синтетический адрenaлин, лекарственное средство под торговым названием «Адрenaлин (эпинефрин)» (Московский эндокринный завод, Россия).



Таблица 3. Места отбора и типы изученных образцов почв.

№ образца	Район отбора образца	Место отбора образца	Горизонт отбора образца	Тип почвы
1	Раменский район Московской области	обочина дороги, вблизи железнодорожных путей	A	дерново-подзолистая почва
2	_____ " _____	обочина дороги	A <sub>1</sub>	дерново-подзолистая почва
3	_____ " _____	обочина дороги	A <sub>1</sub>	дерново-подзолистая, песчаная почва
4	_____ " _____	поле, вблизи песчаного карьера	A <sub>1</sub>	дерново-подзолистая почва
5	_____ " _____	лесная зона	A <sub>1</sub>	серая лесная почва
6	Озерский район Московской области	обочина дороги, вблизи железнодорожных путей	A	дерново-подзолистая почва
7	_____ " _____	обочина дороги	A <sub>1</sub>	дерново-подзолистая почва
8	_____ " _____	обочина дороги.	A <sub>1</sub>	дерново-подзолистая, песчаная почва
9	_____ " _____	поле, вблизи песчаного карьера	A <sub>1</sub>	дерново-подзолистая почва
10	_____ " _____	лесная зона	A <sub>1</sub>	серая лесная почва

Таблица 4. Место сбора и название изученных лекарственных растений.

Название растения	Семейство	Лечебное действие <sup>1</sup>	Место отбора образца
<i>Achillea millefolium</i> L. (тысячелистник обыкновенный)	Астровые или сложноцветные ( <i>Asteraceae</i> )	антибактериальное, противовоспалительное, противомалярийное	г. Москва, природно– исторический парк «Кузьминки»
<i>Aloe arborescens</i> L. (алоэ древовидное)	Асфodelовые ( <i>Asphodeloideae</i> )	антибактериальное, противовоспалительное	г. Москва, комнатное растение
<i>Anthoxantum odoratum</i> L. (душистый колосок обыкновенный)	Злаки ( <i>Poaceae</i> )	антибактериальное, противовоспалительное	Московская область, поселок Семеновский
<i>Arctium lappa</i> L. (лопух большой)	Астровые или сложноцветные ( <i>Asteraceae</i> )	антибактериальное, противовоспалительное	Московская область, поселок Семеновский
<i>Convallaria majalis</i> L. (ландыш майский)	Спаржевые ( <i>Asparagaceae</i> )	антибактериальное, противовоспалительное	г. Москва, природно– исторический парк «Кузьминки»
<i>Fragaria vesca</i> L. (земляника лесная)	Розовоцветные ( <i>Rosaceae</i> )	антибактериальное, противовоспалительное	Московская область, поселок Семеновский

<sup>1</sup> URL: <http://www.mordovnik.ru/atlas>

Таблица 4. Продолжение

Название растения	Семейство	Лечебное действие <sup>1</sup>	Место отбора образца
<i>Geranium pratense</i> L. (герань луговая)	Гераниевые ( <i>Geraniaceae</i> )	антибактериальное, противовоспалительное	Московская область, поселок Семеновский
<i>Hippophae rhamnoides</i> L. (облепиха)	Лоховые ( <i>Elaeagnaceae</i> )	противовоспалительное	Московская область, поселок Семеновский
<i>Lysimachia nummularia</i> L. (вербейник монетчатый)	Первоцветные ( <i>Primulaceae</i> )	противовоспалительное	Московская область, поселок Семеновский
<i>Matricaria matricarioides</i> (ромашка душистая, безъязычковая)	Астровые или сложноцветные ( <i>Asteraceae</i> )	противовоспалительное	г. Москва, природно– исторический парк «Кузьминки»
<i>Melilotus officinalis</i> L. (донник лекарственный)	Бобовые ( <i>Fabaceae</i> )	противовоспалительное	Московская область, поселок Семеновский
<i>Mentha arvensis</i> L. (мята полевая)	Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> )	противовоспалительное, противотуберкулезное	Московская область, поселок Семеновский
<i>Plantago major</i> L. (подорожник большой)	Подорожниковые ( <i>Plantaginaceae</i> )	антибактериальное, противовоспалительное	Московская область, поселок Семеновский

Таблица 4. Продолжение

Название растения	Семейство	Лечебное действие <sup>1</sup>	Место отбора образца
<i>Rosa cinnamomea</i> (шиповник коричный)	Розовоцветные ( <i>Rosaceae</i> )	антибактериальное, противовоспалительное,	Московская область, поселок Семеновский
<i>Rubus idaeus</i> L. (малина обыкновенная)	Розовоцветные ( <i>Rosaceae</i> )	антибактериальное, противовоспалительное	Московская область, поселок Семеновский
<i>Tanacetum vulgare</i> L. (пижма обыкновенная)	Астровые или сложноцветные ( <i>Asteraceae</i> )	противовирусное, антибактериальное, противовоспалительное	г. Москва, природно– исторический парк «Кузьминки»
<i>Taraxacum officinale</i> L. (одуванчик лекарственный)	Астровые или сложноцветные ( <i>Asteraceae</i> )	противовоспалительное	г. Москва, природно– исторический парк «Кузьминки»
<i>Trifolium pratense</i> L. (клевер луговой)	Бобовые ( <i>Fabaceae</i> )	противовирусное, противомаларийное	Московская область, поселок Семеновский
<i>Urtica dioica</i> L. (крапива двудомная)	Крапíвные ( <i>Urticaceae</i> )	противовоспалительное	Московская область, поселок Семеновский
<i>Viola odorata</i> L. (фиалка душистая)	Фиáлковые ( <i>Violáceae</i> )	противотуберкулезное, противовоспалительное	г. Москва, природно– исторический парк «Кузьминки»

Гетероауксин – синтетический стимулятор роста растений из группы ауксинов. В малых концентрациях гетероауксин стимулирует, в больших – ингибирует рост растений [Галактионов, 1988]. В работе использовали препарат «Гетероауксин» (ООО Ортон, Россия), действующим веществом которого является калиевая соль индолил-3-уксусной кислоты (50 г/кг). Индолил-3-уксусная кислота (ИУК) - биогенный амин (биомедиатор), фитогормон, стимулятор роста растений. Образуется из аминокислоты триптофана в листьях, а затем перемещается в растущие стебли и корни растений. Под действием ИУК активируются биохимические процессы в протоплазме, изменяются интенсивность дыхания, уровень окислительно-восстановительных процессов и кислородный обмен, которые являются важными условиями роста и обмена веществ в растениях [Herbert et al., 1964].

## **2.2. Методы селективного выделения актинобактерий из почвы и растений**

### 2.2.1. Селективное выделение актинбактерий из почвенных образцов

Выделение актинобактерий из почвенных образцов проводили традиционным методом поверхностного посева на органическую среду 2 Гаузе<sup>2</sup> и овсяный агар<sup>2</sup> [Гаузе и др., 1983].

Для приготовления почвенных суспензий 100 мг почвы помещали в 10 мл стерильной воды, встряхивали в течение 10 минут, затем суспензию разводили в отношении 1:1000 и 1:10000 и высевали на чашки Петри с селективной средой.

В среду, на которую производился посев почвенных суспензий, добавляли адреналин в концентрации 1 мкг/мл или гетероауксин в концентрации 20 мкг/мл. Также в среды добавляли антибиотики: налидиксовую кислоту (20 мкг/мл) для ингибирования роста стелющихся бактерий и амфотерицин В (50 мкг/мл) для ингибирования роста грибов [Терехова и др., 1990; Gurung et al., 2009]. Как известно, налидиксовая кислота в указанной концентрации не подавляет роста актинобактерий [Алферова и др., 1989].

---

<sup>2</sup> состав питательных сред приведен в приложении «Состав питательных сред».

Посев почвенных суспензий проводили в семикратной повторности. Засеянные чашки инкубировали в течение 14 суток при 28°C.

### 2.2.2. Селективное выделение актинобактерий из листьев лекарственных растений

Для приготовления опытных образцов 1 г растительной ткани очищали от земли и тщательно промывали под проточной водой. Поверхностную стерилизацию листьев проводили в 75% этиловом спирте в течение 5 минут, затем в 1% растворе гипохлорита натрия (NaOCl) в течение 20 минут. Далее образцы промывали 3 раза стерильной дистиллированной водой и выдерживали в 10% растворе гидрокарбоната натрия (NaHCO<sub>3</sub>) в течение 5 – 10 минут [Wason, 1988; Araújo et al., 2000; Otaguro et al., 2001; Cao et al., 2004; Omarjee et al., 2004; Qin et al., 2009]. Затем растительные ткани выдерживали в растворе гетероауксина в концентрации 20 мкг/мл или в растворе циркона в концентрации 1 мкг/мл в течение 20 минут. Предварительно растворы гетероауксина и циркона пропускали через мембранный фильтр диаметром пор 0,22 мкм с целью стерилизации растворов. После предобработки гетероауксином и цирконом образцы листьев нарезали маленькими кусочками, помещали в пробирки со стерильной дистиллированной водой (10 мл) и выдерживали в термостате в течение 1 часа при температуре 28°C, периодически перемешивая. Полученные суспензии высевали традиционным методом поверхностного посева на органическую среду 2 Гаузе и овсяный агар [Гаузе и др., 1983], затем инкубировали при температуре 28°C в течение 3-х недель.

Посев полученных образцов в каждом варианте опытов проводили в десятикратной повторности. Засеянные чашки инкубировали в течение 3-х недель при температуре 28°C.

Во всех экспериментах была проверена *эффективность поверхностной стерилизации* двумя способами. Первый способ заключался в перемешивании и дальнейшем посеве на органический агар 2 Гаузе последних порций дистиллированной воды, которой промывали исследуемые образцы. Затем

чашки Петри помещали в термостат и инкубировали в течение 3-х недель при температуре 28°C. Вторым способом заключался в получении отпечатков стерилизованных поверхностных тканей листьев на органическом агаре 2 Гаузе, после чего чашки помещали в термостат и инкубировали в течение 3-х недель при 28°C [Qin et al., 2009]. Отсутствие роста колоний на чашках говорило об эффективности поверхностной стерилизации растительных тканей.

### **2.3. Количественный учет выделенных актинобактерий**

Количество актинобактерий в 1 грамме почвы и растительной ткани определяли по числу колоний, образующихся при высеве на агаровую среду. Выросшие колонии выделяли в чистую культуру и определяли их систематическое положение.

Для оценки численности актинобактерий в почве и листьях растений использовали общие и специфические методы математической статистики [Платонов, 2000; Gorban et al., 2010].

### **2.4. Определение таксономического положения выделенных культур актинобактерий**

Выросшие на чашках Петри колонии выделяли в чистую культуру в пробирки со скошенным минеральным агаром 1 Гаузе, овсяным агаром и органическим агаром 2 Гаузе [Гаузе и др., 1983]. Каждую пересеянную колонию регистрировали для того, чтобы после проведения родовой идентификации выделенных культур можно было установить количество актинобактерий разных родов.

Для определения родовой принадлежности штаммов изучали фенотипические (морфологические и культуральные) признаки выделенных культур, химический состав клеточных стенок и геносистематические признаки культур. Таксономическое положение культур определяли, используя определитель актинобактерий [Гаузе и др., 1983], определитель Берджи

[Определитель бактерий Берджи, 1997; Yamaguchi, 1965] и базы данных GenBank NCBI<sup>3</sup> и Ribosomal Database Project<sup>4</sup> (RDP).

#### 2.4.1. Изучение фенотипических признаков

*Морфологические признаки* изучали у культур, выращенных на минеральном агаре 1 Гаузе и овсяном агаре [Гаузе и др., 1983], просматривая в световом микроскопе OLYMPUS BX-41 при увеличении  $\times 200$ ,  $\times 400$  и  $\times 1000$  мкм.

*Культуральные признаки* исследовали по окраске воздушного и субстратного мицелия, образованию растворимых пигментов и характеру роста культур на минеральном агаре 1 Гаузе и органическом агаре 2 Гаузе.

#### 2.4.2. Изучение состава клеточных стенок

Изомеры диаминопимелиновой кислоты (ДАПК) и анализ дифференцирующих сахаров в гидролизатах целых клеток определяли с помощью методов восходящей тонкослойной хроматографии в целлюлозном слое [Lechevalier et al., 1971]. Биомассу актинобактерий наращивали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 150 мл жидкой органической среды 2 Гаузе, при постоянном качании (180 об/мин) в течение 4 – 10 суток при температуре 28°C.

Мицелий отфильтровывали, промывали дистиллированной водой, этанолом, после чего высушивали при 28°C. Сухой мицелий растирали в ступке.

Для определения ДАПК мы использовали модифицированные условия проведения гидролиза мицелия: 1 мг сухого, растертого в ступке, мицелия помещали в ампулу с 10 мкл 6н соляной кислотой (HCl) [Ли, 2003]. Ампулы запаивали и помещали для проведения гидролиза в сушильный шкаф при температуре 105°C на 18 часов. После охлаждения 1 мкл гидролизата наносили на целлюлозную пластинку «Merk» и в качестве стандарта на тот же лист

---

<sup>4</sup> URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<sup>5</sup> URL: <http://rdp.cme.msu.edu>



наносили 1 мкл 0,01М раствора ДАПК, который содержал LL- и мезо-ДАПК. Восходящая хроматография выполнялась в системе растворителей метанол: дистиллированная вода: бн соляная кислота: пиридин (80:26:4:10) в течение 3 – 5 часов. После высушивания лист обрабатывали нингидриновым раствором и нагревали в течение двух минут при температуре 100°С для проявления пятен. Пятна обеих конфигураций ДАПК имели оливково-зеленый цвет, быстро желтели на воздухе. Другие аминокислоты в гидролизате образовывали фиолетовые пятна и двигались быстрее, чем ДАПК. Rf у мезо-ДАПК меньше, чем у LL-ДАПК, поэтому пятно мезо-ДАПК расположены ближе к линии нанесения, чем LL-ДАПК. В гидролизатах некоторых культур проявлялось пятно ОН-изомера ДАПК, Rf которого меньше, чем у мезо-ДАПК.

Для определения дифференцирующих сахаров в гидролизатах целых клеток 5 мг сухого мицелия помещали в ампулу с 100 мкл 1н серной кислотой (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ампулу запаивали. Гидролиз мицелия проводили в течение 1 часа на кипящей водяной бане. К гидролизату приливали насыщенный раствор гидроксида бария (Ba(OH)<sub>2</sub>) и доводили рН раствора до 5,0 – 5,5. Осадок отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 минут. К надосадочной жидкости приливали 500 мкл хлороформа и упаривали при температуре 28° – 37°С. Сухой остаток растворяли в 40 мкл дистиллированной воды и 2 мкл гидролизата наносили на целлюлозную пластинку «Merk». В качестве контроля использовали по 1 мкл смеси сахаров: галактозы, глюкозы, маннозы, арабинозы, ксилозы, рамнозы. Разделение дифференцирующих сахаров проводили в системе бензол: н-бутанол: пиридин: вода (10:50:30:30), предложенной Gaillard'ом [Gaillard, 1953]. После высушивания хроматограммы сахара проявляли кислым анилин-фталатом – реагентом «Fluka» и нагревали при температуре 100°С в течение 3 – 4 минут. На хроматограмме сахара от стартовой линии располагались в следующем порядке: галактоза, глюкоза, манноза, арабиноза, ксилоза, рамноза. Пятна гексоз на хроматограмме имели бурую окраску, пентоз – красную.

На основании полученных из хроматограмм данных о составе клеточных стенок определяли родовую принадлежность культур, используя данные определителя Берджи [Определитель бактерий Берджи, 1997] и материалы сравнения состава клеточных стенок у различных актинобактерий [Yamaguchi, 1965].

#### 2.4.3. Изучение геносистематических признаков

Изучение геносистематических признаков включало несколько этапов: выделение ДНК из клеточной биомассы, амплификацию ПЦР-фрагментов генов 16S рРНК, горизонтальный электрофорез продуктов амплификации, секвенирование нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и анализ полученных нуклеотидных последовательностей.

Выделение ДНК проводили из биомассы актинобактерий, выращенных на жидкой органической среде 2 Гаузе, применяя набор для выделения Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, США) согласно методике Манучаровой Н.А. [Манучарова, 2010].

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, была использована универсальная система праймеров: 27f – 1492r (СИНТОЛ, Россия) (таблица 5). Амплификацию проводили в автоматическом амплификаторе 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) в следующем температурно-временном режиме: иницирующая денатурация 94°C – 4 минуты, 30 циклов: 94°C – 1 минуты, 51°C – 1 минуты и 72°C – 2 минуты, затем финальная элонгация для достройки незавершенных цепей при 72°C – 10 минут. Для проведения ПЦР амплификации использовали набор реагентов GenPak qPCR Core (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) содержащий 3,2 пМ каждого праймера, 1Ед. Таq ДНК полимеразы, 200 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфаты, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 175 нг каждой ДНК матрицы. Суммарный объем реакционной смеси – 20 мкл.

Таблица 5. Праймеры, использованные в работе.

Название праймера	5' – 3' последовательность
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
341f –gcd	CCTACGGGAGGCAGCAG
785f	GGMTTAGATACCTGGTAGTCC
907r	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT
1100r	GGGTTGCGCTCGTTG
1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT

Продукты амплификации подвергали горизонтальному электрофорезу в 1%-ном агарозном геле при напряженности электрического поля 120 В/см, силе тока 33 мА/см и окрашивали этидиум бромидом. В качестве электрофоретического буфера использовали 1×трис-боратный буфер [10×ТВЕ буфер: 0,89 М трис-НСl (108 г/л); 0,89 М борная кислота (55 г/л); 20 мМ ЭДТА (9,3 г/л)] [Манучарова, 2010]. После электрофоретического разделения полосы ДНК визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК проводили с использованием прямых и обратных праймеров 27f, 341f-gcd, 785f, 907r, 1100r и 1492r на автоматическом капиллярном секвенаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Для проведения реакции секвенирования ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, была использована универсальная система праймеров: 27f – 1492r (СИНТОЛ, Россия) (таблица 5). Для проведения реакции секвенирования к 40 нг плазмидной ДНК с праймером, предварительно высушенном при 65°C, добавляли реакционную смесь (10 мкл). Реакцию проводили в автоматическом амплификаторе 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) в следующем температурно-временном режиме: иницирующая денатурация 96°C – 1 минута, 25 циклов при 96°C – 10 секунд, 50°C – 5 секунд, 60°C – 4 минуты. По окончании реакции секвенирования пробу

очищали методом прямого переосаждения ДНК в мягких условиях<sup>5</sup>. Высушенный осадок ресуспендировали в 20 мкл Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, США). Полученный раствор переносили в ячейки платы.

Редактирование последовательностей осуществляли с помощью редактора BioEdit, а их множественное выравнивание с использованием программы CLUSTAL OMEGA 1.1.1. Идентификацию актинобактерий проводили при помощи сравнения нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагментов генов 16S рРНК с последовательностями, представленными в базе данных GenBank NCBI по протоколу nBLAST<sup>6</sup> и Ribosomal Database Project<sup>7</sup> (RDP). Построение филогенетических деревьев исследуемых штаммов актинобактерий производили с использованием алгоритма «ближнего соседа» («neighbor-joining») методами, реализованными в пакете программы MEGA 6.

## **2.5. Изучение антагонистических свойств выделенных культур актинобактерий**

Антибиотические свойства выделенных культур актинобактерий на твердых (агаризированных) питательных средах проверяли методом штриха на органическом агаре 2 Гаузе по отношению к следующим тест-организмам: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА S-1.

Для этого на питательном агаре по диаметру чашки Петри делали штриховой посев исследуемой культуры актинобактерии. Через 3 – 10 суток, когда отмечался хороший рост актинобактерии, перпендикулярно его штриху подсевали тест-организмы. Чашки Петри помещали на 48 часов в термостат при температуре 28°C, после чего устанавливали действие антагониста на тест-микроорганизмы по зонам подавления роста последних. Наиболее активные и

---

<sup>5</sup> Описание метода прямого переосаждения ДНК в мягких условиях, URL: [http://www.genome-centre.ru/downloads/NH4Ac\\_EtOH.pdf](http://www.genome-centre.ru/downloads/NH4Ac_EtOH.pdf)

<sup>7</sup> URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<sup>8</sup> URL: <http://rdp.cme.msu.edu>

интересные в таксономическом отношении культуры передавали для дальнейших исследований в Сектор поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий (зав. О. В. Ефременкова) и в лабораторию разработки методов поиска биологически активных соединений (зав. А. С. Тренин) ФГБНУ Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе (ФГБНУ «НИИНА»).

## 2.6. Статистическая обработка результатов исследований

Статистическую обработку результатов всех исследований проводили при помощи программы Excel 2010 (Microsoft Inc., 2011), рассчитывая приведенные ниже параметры.

Колонии актинобактерий подсчитывали на каждой чашке Петри во всех вариантах опыта, при этом количество колоний варьировало при повторных посевах одного и того же опытного образца.

Среднее количество колоний актинобактерий на чашке Петри ( $M'$ ) находили по формуле:

$$M' = \frac{\sum V_i}{N} \quad (1)$$

где  $V_i$  – количество колоний актинобактерий на одной из чашек Петри,  $N$  – количество чашек Петри, на которых подсчитывали колонии актинобактерий.

Ошибку средней ( $m'$ ) вычисляли по формуле:

$$m' = \frac{\sqrt{\frac{(V_i - M')^2}{N(N - 1)}}}{N} \quad (2)$$

Среднее количество актинобактерий ( $M$ ), содержащихся в 1 грамме почвы или растительной ткани, рассчитывали по среднему числу колоний актинобактерий, выросших на чашке Петри данного опыта, так как последнее соответствует определенному объему исследуемой суспензии определенного разведения:

$$M = M' \frac{K}{V} \quad (3)$$

где  $K$  – разведение, из которого произведен высев,  $V$  – объем суспензии, взятой для посева, мл (в нашем исследовании  $V = 0,01$  мл).

Тогда:

$$m = m' \frac{K}{V} \quad (4)$$

где  $m$  и  $m'$  – соответственно ошибки указанных средних.

По известным значениям выборочных характеристик можно установить интервал, в котором с той или иной вероятностью находится величина генерального параметра. Так, наиболее вероятное количество актинобактерий –  $M$ , содержащихся в 1 г почвы или растений при уровне вероятности 95% ( $P_{0,95}$ ) можно вычислить по формуле:

$$M = M + 2m \quad 5$$

где  $M$  – среднее количество актинобактерий, содержащихся в 1 г почвы или растений выборочных образцов при соответствующем методе выделения,  $2m$  – доверительный интервал средней, который вычисляют по формуле:

$$2m = 2 - t m \quad (6)$$

где  $m$  – ошибка средней,  $2 - t$  – критерий при  $P_{0,95}$ ,  $t$  – уровень вероятности, равный 0,95.

Для оценки достоверности различий между средними значениями численности актинобактерий при различных методах выделения использовали  $t$ -критерий Стьюдента ( $P \leq 0,05$ ):

$$t_{\alpha} = \frac{M_1 - M_2}{m_1^2 + m_2^2} \geq t \quad (7)$$

где  $M_1$  и  $M_2$  – сравниваемые выборочные средние,  $m_1^2$  и  $m_2^2$  – квадраты ошибок средних,  $t_{\alpha}$  – стандартное значение критерия, находимое по таблице Стьюдента

по числу свободы ( $N_1 + N_2 - 2$ ) для одного из трех порогов вероятности,  $N_1$  и  $N_2$  – обозначают соответственно число опытов (число повторностей), из которых получены средние  $M_1$  и  $M_2$ .

### Глава 3. РАЗРАБОТКА НОВОГО СЕЛЕКТИВНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ АКТИНОБАКТЕРИЙ ИЗ ПОЧВЫ С ДОБАВЛЕНИЕМ БИОГЕННЫХ АМИНОВ

Успех выявления продуцентов новых антибиотиков в большой степени зависит от применения новых, нестандартных методов выделения культур. Среди большого их разнообразия важная роль принадлежит методам селективной изоляции, основанным на принципе увеличения относительного количества определенных групп микроорганизмов путем создания лучших условий для их роста и выживания или путем избирательного подавления роста нежелательных культур.

Для селективного выделения актинобактерий из естественных мест обитания используют разнообразные приемы, в том числе методы предварительной обработки изучаемых образцов физическими факторами – тепловая обработка, центрифугирование, обработка волнами сверхвысокой частоты (СВЧ), ультразвуком; химическими факторами – обработка образцов химическими соединениями фенола, хлорида бензетониума, хлорамина-Т, хлорамина-Б, карбонатом кальция [Алферова и др., 1988; Hayakawa et al., 1991a; Hayakawa et al., 1991b; Hayakawa et al., 1996; Hayakawa et al., 1997; Михайлова, 2000; Kurtböke et al., 1992; Hu et al., 1993; Éthier, 1994; Stutzenberger, 1994; Терехова и др., 1990; Терехова и др., 1989; Miquely et al., 1993; Suzuki et al., 2001; Otoguro et al., 2001].

В литературе представлены данные об индукции роста и стабилизации популяционного состава нейромедиаторными аминами (серотонином, норадреналином и дофамином) актинобактерий *Saccharopolyspora erythraea*, немиецелиальных бактерий – *Enterococcus faecalis*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* и ряда других энтеробактерий [Кагарлицкий и др., 2003; Филиппова и др., 2010]. Представленные исследования дали основание полагать, что гормональные соединения группы катехоламинов будут способствовать эффективному



выделению редких родов актинобактерий из почвы за счет стимуляции прорастания большего количества спор актинобактерий, находящихся в почве. Помимо адреналина для выделения актинобактерий из почвы представляло интерес изучить другое вещество из группы биогенных аминов, которое обладает высокой физиологической активностью – индолил-3-уксусную кислоту (ИУК). Ввиду того, что ИУК плохо растворима в воде, в представленной работе была использована водорастворимая калиевая соль ИУК, которая является действующим веществом препарата «Гетероауксина» (ООО Ортон, Россия). Работы по применению адреналина и ИУК для выделения актинобактерий из естественных мест обитания отсутствовали. В связи с этим, для изучения влияния биогенных аминов на прорастание спор актинобактерий нами был разработан метод изоляции актинобактерий из почвы с применением данных биомедиаторов.

### **3.1. Изучение влияния биогенных аминов на прорастание спор почвенных актинобактерий**

Первоначально было изучено влияние биогенных аминов на прорастание спор почвенных актинобактерий. Для этого была проведена серия опытов: в первом варианте растворы биогенных аминов были добавлены в почвенные суспензии с последующим высевом на агаризованные питательные среды, во втором варианте растворы биогенных аминов были добавлены в селективные среды, на которые производился посев почвенных суспензий. В каждом варианте опытов растворы селективных агентов брали в нескольких концентрациях: адреналина – 0,1, 0,5, 1, 1,5 и 2 мкг/мл, гетероауксина – 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мкг/мл. В результате проведенных экспериментов были подобраны оптимальные концентрации действия адреналина – 1 мкг/мл и гетероауксина – 20 мкг/мл; также было обнаружено, что стимулирующее действие биологически активных соединений на прорастание спор актинобактерий происходит при их добавлении в селективные среды.

В связи с тем, что опыт с добавлением селективных агентов в питательные среды дал положительные результаты, было решено проводить дальнейшие исследования с применением биологически активных соединений адреналина (1 мкг/мл) и гетероауксина (20 мкг/мл) в качестве селективных агентов питательной среды. Так, общее количество выросших колоний на средах с биомедиаторами было выше, чем на контрольных чашках. Количество выросших колоний на селективной среде с добавлением адреналина увеличивалось в 1,6 раз, а с добавлением гетероауксина в 1,5 раза по сравнению с контролем (таблица 6). В среднем увеличение количества выделенных актинобактерий при добавлении стимуляторов прорастания спор составило 44,4% при добавлении адреналина и 43,6% при добавлении гетероауксина.

Таблица 6. Влияние адреналина и гетероауксина на прорастание спор актинобактерий.

№ образца	КОЕ актинобактерий / г почвы $\times 10^5$					
	Контроль		Адреналин		Гетероауксин	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
1	60 $\pm$ 2,44	100	109 $\pm$ 6,29	155	109 $\pm$ 9,27	155
2	66 $\pm$ 2,57	100	101 $\pm$ 6,18	165	113 $\pm$ 9,18	158
3	66 $\pm$ 2,64	100	119 $\pm$ 5,89	155	115 $\pm$ 8,80	157
4	61 $\pm$ 2,76	100	111 $\pm$ 5,01	155	122 $\pm$ 7,9	150
5	57 $\pm$ 2,97	100	105 $\pm$ 3,76	154	113 $\pm$ 5,87	150
6	25 $\pm$ 3,19	100	38 $\pm$ 2,10	152	42 $\pm$ 1,8	168
7	40 $\pm$ 12,04	100	58 $\pm$ 13,20	145	50 $\pm$ 1,76	125
8	44 $\pm$ 13,14	100	53 $\pm$ 15,93	120	52 $\pm$ 1,06	118
9	41 $\pm$ 12,07	100	46 $\pm$ 14,95	112	52 $\pm$ 1,06	127
10	39 $\pm$ 10,32	100	51 $\pm$ 13,20	131	50 $\pm$ 0,97	128
всего	499 $\pm$ 4,52	100	791 $\pm$ 4,84	158	768 $\pm$ 3,62	153

*Примечание:* актинобактерии были выделены на селективных средах с добавлением налидиксовой кислоты (20 мкг/мл) и амфотерицина В (50 мкг/мл); КОЕ – количество колониеобразующих единиц.

Увеличение количества выросших колоний на средах с добавлением биомедиаторов может быть связано с повышением числа проросших спор, что в свою очередь обусловлено сигнальным воздействием биогенных аминов на инициацию прорастания спор [Филиппова и др., 2010], а также за счет ингибирования роста бактерий и грибов антибиотиками, что создавало благоприятные условия для развития колоний актинобактерий [Терехова и др., 1990].

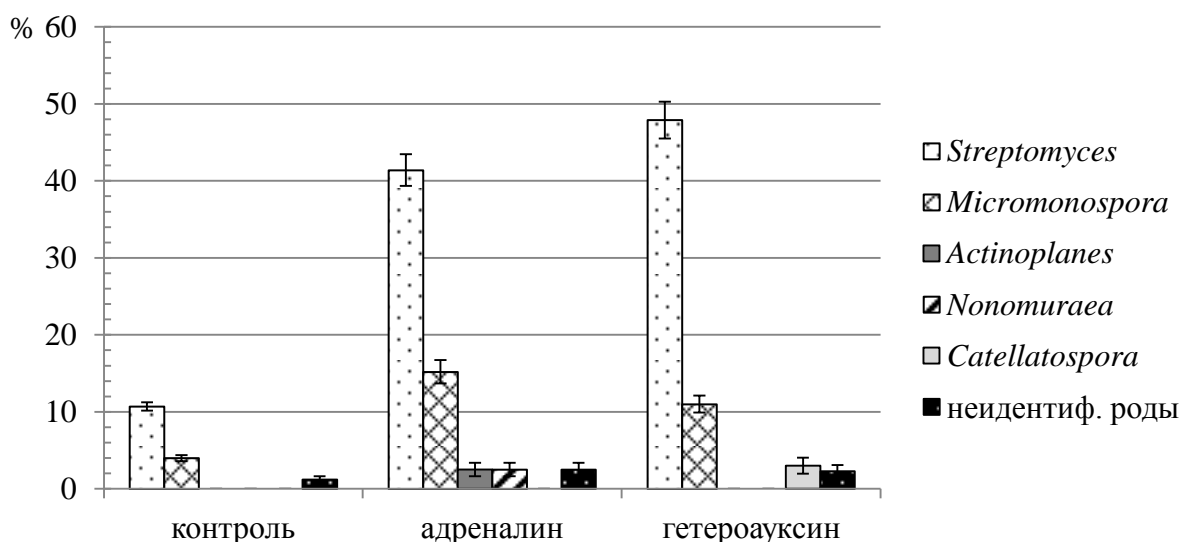
Таким образом, растворы адреналина в концентрации 1 мкг/мл и гетероауксина – 20 мкг/мл являются стимуляторами прорастания спор. Питательные среды с адреналином и/или гетероауксином в сочетании с налидиксовой кислотой и амфотерицином В являются эффективными для увеличения количества выделяемых актинобактерий.

### **3.2. Определение таксономического положения выделенных из почвы культур актинобактерий**

С целью поиска актинобактерий редких родов, представляющих наибольший интерес в качестве продуцентов новых антибиотиков, было изучено таксономическое положение всех выделенных из почвы штаммов.

Всего в чистую культуру из почв Московской области было выделено 1500 штаммов актинобактерий. Все выделенные штаммы разделили на группы, идентичные по культуральным признакам. Таксономическое положение выделенных культур было определено на основании результатов изучения культуральных, морфологических, хемотаксономические и генотипических признаков.

На рисунке 3 показано соотношение количества культур разных родов актинобактерий при выделении их на селективные среды с добавлением биомедиаторов и без них (в контроле). Согласно представленной диаграмме добавление в селективную среду соединений адреналина и гетероауксина способствует увеличению количества выделяемых из почвы культур по сравнению с контролем.



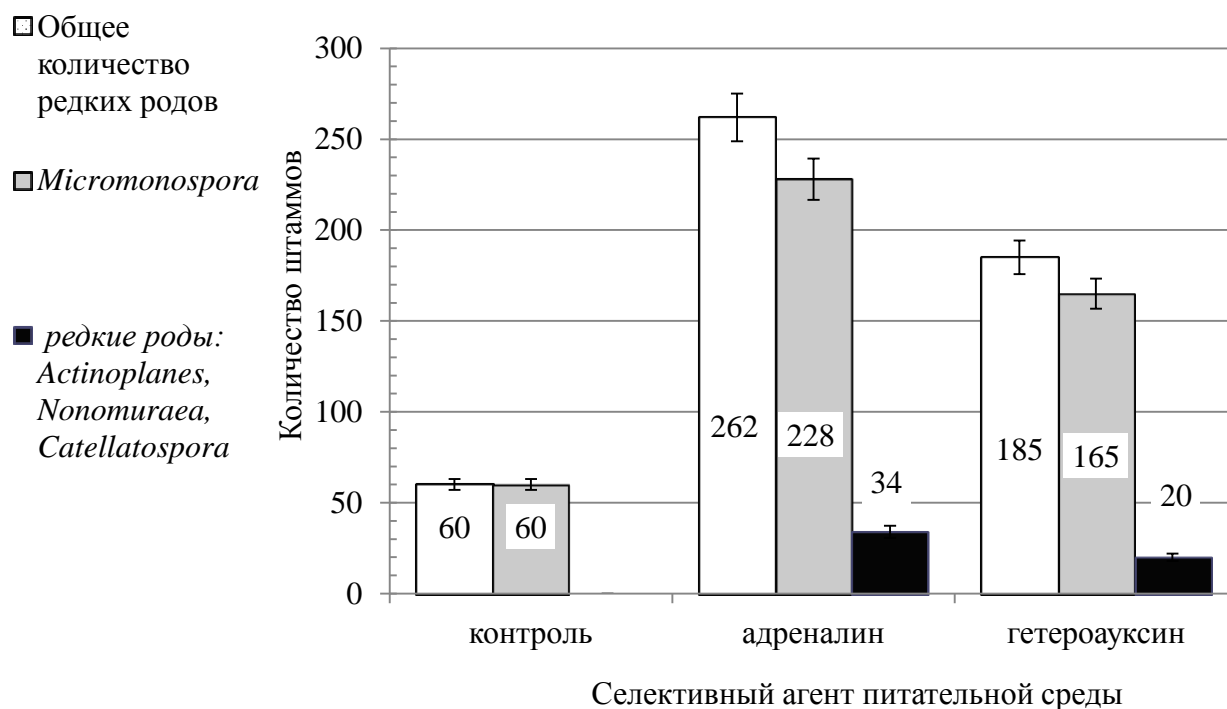
*Примечание:* в процессе работы некоторые штаммы теряли свою жизнеспособность после нескольких пересевов, вследствие чего их таксономическое положение не было определено. Эти культуры были отнесены в группу «неидентифицированные роды» (неидентиф. роды). Достоверность различий соответствует  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 3. Доля культур различных родов порядка Actinomycetales, выделенных из почвенных образцов.

Среди всех выделенных из почвы культур актинобактерий доминирующим был род *Streptomyces* – 960 штаммов из 1500 (64%). Доля выделенных культур *Streptomyces* spp. на селективной среде с гетероауксином (47,9%) была выше, чем в контроле (10,7%) и на селективных средах с адреналином (41,4%).

В настоящее время внимание исследователей, которые работают в области поиска биологически активных веществ, продуцируемых актинобактериями, привлекают культуры так называемых редких родов (не принадлежащих к роду *Streptomyces*) как потенциальных продуцентов неизвестных антибиотиков.

В данной работе из почв выделено 507 культур редких родов актинобактерий, из них 453 культуры принадлежали *Micromonospora* spp. и 54 культуры были отнесены к *Actinoplanes* spp., *Catellatospora* spp. и *Nonomuraea* spp. (рисунок 4).



*Примечание:* достоверность различий соответствует  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 4. Доля редких родов актинобактерий, выделенных из почв.

Выявлена четкая тенденция к увеличению представителей редких родов актинобактерий среди культур, выделенных на средах с биомедиаторами (по сравнению с контролем) (рисунок 4). Доля представителей редких родов актинобактерий по отношению ко всем выделенным из почвы актинобактериям различна в зависимости от добавленных в питательную среду селективных агентов – адреналина или гетероауксина. Добавление адреналина (1 мкг/мл) в селективную среду увеличивало общее количество культур редких родов актинобактерий в 4,4 раза, добавление гетероауксина (20 мкг/мл) – в 3 раза по сравнению с контролем. В контроле все выделенные культуры редких родов принадлежали *Micromonospora* spp.

При добавлении в селективную среду адреналина были выделены культуры *Micromonospora* spp., *Actinoplanes* spp. и *Nonomuraea* spp., а с добавлением гетероауксина – *Micromonospora* spp. и *Catellatospora* spp., в то время как в контроле выделились культуры только *Micromonospora* spp. (таблица 7). На селективных средах с добавлением адреналина доля культур

рода *Micromonospora* возрастала в 3,8 раза, гетероауксина – в 2,75 раза по сравнению с контролем (таблица 7).

Таблица 7. Таксономическое положение выделенных из почвы культур порядка Actinomycetales.

Род	Количество штаммов					
	контроль		Адреналин		Гетероауксин	
	число	%	число	%	число	%
Всего	165	100	675	100	660	100
<i>Streptomyces</i>	103	62,4	397	58,8	460	69,7
<i>Micromonospora</i>	60	36,4	228	33,8	165	25
<i>Actinoplanes</i>	–	–	17	2,5	–	–
<i>Catellatospora</i>	–	–	–	–	20	3
<i>Nonomuraea</i>	–	–	17	2,5	–	–
Неидентифицированные роды	2	1,2	16	2,4	15	2,3

Итак, добавлением в питательные среды биомедиаторов – адреналина (1 мкг/мл) или гетероауксина (20 мкг/мл), можно значительно увеличить количество выделяемых культур порядка Actinomycetales, в том числе представителей редких родов актинобактерий. Кроме того, раствор адреналина может применяться в качестве селективного агента для направленного выделения культур рода *Micromonospora*, которые известны как продуктивный источник многих антибиотиков, в том числе и применяемых в клинике (группа аминогликозидов).

### 3.3. Изучение антагонистических свойств почвенных актинобактерий

У 1473 выделенных из почвы культур актинобактерий были изучены антибиотические свойства в отношении грамположительных тест-бактерий – *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; грамотрицательных тест-бактерий – *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; и дрожжеподобных грибов – *Saccharomyces cerevisiae* ИНА S-1. Считается, что

культуры, подавляющие рост только грамположительных тест-бактерий, обладают узким спектром действия, в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-бактерий – широким спектром действия.

Результаты изучения антагонистических свойств почвенных актинобактерий показали, что на селективных средах с добавлением биомедиаторов антибиотически активных культур выделено больше по сравнению с контролем (таблица 8). Так, активных культур в отношении грамположительных тест-бактерий, в том числе MRSA, было больше в 1,5 раза на средах с биогенными аминами (рисунок 5). Культур, обладающих широким спектром действия, также было выделено больше на средах с добавлением биомедиаторов (по сравнению с контролем). Количество антибиотически активных культур в отношении *Saccharomyces cerevisiae* ИНА S-1 по сравнению с контролем было больше на среде с адреналином в 2,6 раз, с гетероауксином – в 2,3 раза.

Таблица 8. Количество антибиотически активных штаммов актинобактерий, выделенных из почвы на селективные среды с биогенными аминами.

Селективный агент	Количество изученных культур							
	всего изучено культур		Активные в отношении грамположительных бактерий		Активные в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий		Активные в отношении дрожжеподобных грибов	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Контроль	163±1,2	100	64±0,5	39,3	15±0,1	9,2	28±0,21	17,2
Адреналин	669±5	100	395±2,9	59	123±0,9	18,4	295±2,2	44
Гетероауксин	641±4,8	100	366±2,7	57	112±0,8	17,5	257±1,9	40



*Примечание:* грамположительные бактерии: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633;

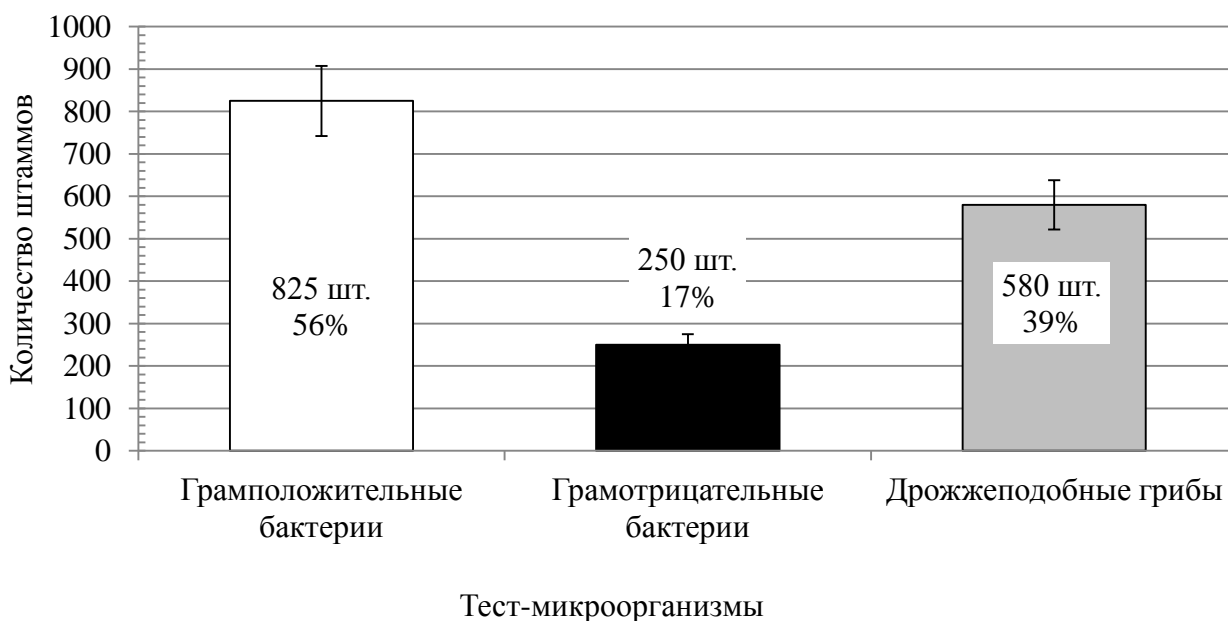
MRSA – метициллинорезистентный золотистый стафилококк *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA).

Достоверность различий соответствует  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 5. Доля выделенных из почвы актинобактериальных штаммов, активных в отношении грамположительных тест-бактерий, включая MRSA.

Резюмируя приведенные в таблице 8 данные, можно отметить, что актинобактерии, активные в отношении тест-бактерий, составили 1075 штаммов (73%) из всех 1473 (100%) изученных культур. Большинство активных культур – 825 штаммов (56%) обладало узким спектром действия, подавляя рост только грамположительных тест-бактерий. Актинобактерии с широким спектром действия составляли 250 штаммов (17%), количество активных культур в отношении дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae* ИНА S-1 было 580 штаммов (39%) от всех изученных культур (рисунок 6).





*Примечание:* достоверность различий соответствует  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 6. Активность почвенных актинобактерий в отношении тест-микрорганизмов.

Можно заключить, что новый метод выделения актинобактерий из почвы с добавлением в питательную среду селективных агентов – адреналина и гетероауксина, позволил не только увеличить количество выделенных культур актинобактерий, но также способствовал выделению большего количества актинобактерий, обладающих антибиотической активностью по отношению к тест-бактериям. Внесение в селективные среды биогенных аминов можно рекомендовать в качестве метода выделения из почвы актинобактерий – продуцентов антибиотиков, активных в отношении грамотрицательных тест-бактерий и дрожжеподобных грибов.

### 3.4. Описание редких культур актинобактерий, выделенных из почвы

В процессе разработки метода селективного выделения актинобактерий из почвы с применением биогенных аминов был выделен ряд культур актинобактерий, представляющих интерес как с таксономической точки зрения, так и в качестве продуцентов антибиотиков. Данные культуры относились к редким родам актинобактерий. Для идентификации они были разделены на группы штаммов, схожих по морфологическим, культуральным и

хемотаксономическим признакам. Геносистематические признаки изучались у одного представителя каждой группы. Ниже представлены результаты изучения их фенотипических, хемотаксономических, генотипических признаков и антибиотических свойств.

#### 3.4.1. Культура *Actinoplanes auranticolor* ИНА 01094

Культура была выделена из образца почвы, собранного у обочины автомобильной дороги в поселке Первомайский Московской области. Посев образца почвы проводился на органическую среду 2 Гаузе с добавлением адреналина (1 мкг/мл).

*Морфология.* Хорошо развитый ветвящийся мицелий, воздушный мицелий отсутствует. На вегетативном мицелии образуются спорангии сферической и неправильной формы.

*Клеточная стенка.* В гидролизатах целых клеток культуры присутствует мезо-диаминопимелиновая кислота (мезо-ДАПК) и моносахариды галактоза, глюкоза, а также следы арабинозы и ксилозы (II тип клеточной стенки).

*Минеральный агар 1 Гаузе.* Рост хороший. Воздушного мицелия нет. Субстратный мицелий красновато-желтый. Растворимого пигмента нет.

*Овсяный агар.* Рост хороший. Воздушного мицелия нет. Субстратный мицелий красновато-желтый. Растворимого пигмента нет.

*Органический агар 2 Гаузе.* Рост хороший. Воздушного мицелия нет. Субстратный мицелий красновато-желтый. Растворимого пигмента нет.

*Антибиотические свойства.* На агаровой среде культура активна по отношению к грамположительным бактериям и дрожжеподобным грибам; при глубинном культивировании на изученных средах активности не обнаружено.

*Филогенетический анализ.* Выделенная культура идентифицирована согласно фенотипическим и генотипическим признакам как *Actinoplanes auranticolor*. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК депонированы в GenBank NCBI с присвоением индивидуального номера доступа KJ425224.

Культура внесена в коллекцию культур ИНА (INA) под номером 01094. При помощи программы MEGA6 построена дендрограмма, отражающая филогенетическое положение исследуемой культуры по отношению к некоторым типовым<sup>8</sup> штаммам рода *Actinoplanes* (рисунок 7).

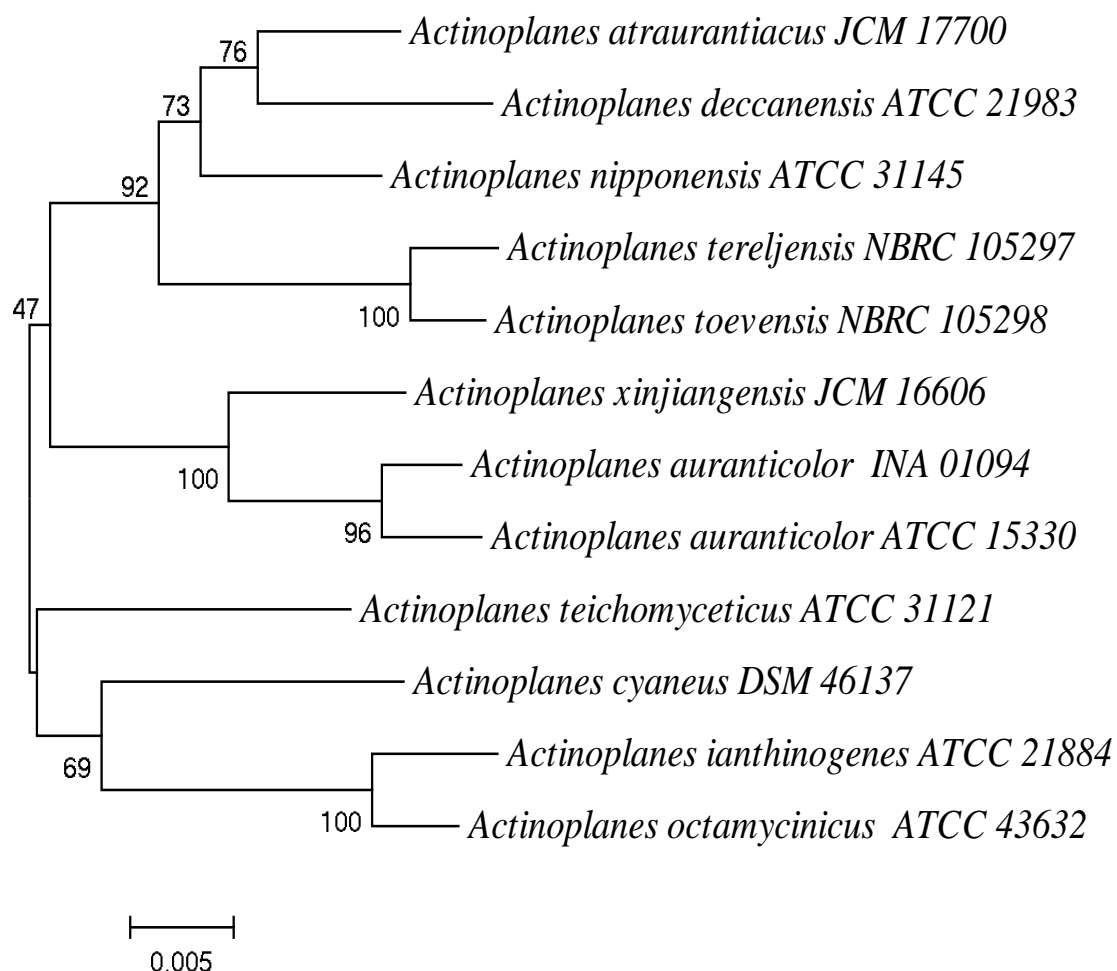


Рисунок 7. Филогенетическое дерево почвенной культуры *Actinoplanes auranticolor* INA 01094, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «ближайшего соседа» (neighbor-joining), масштаб соответствует эволюционным расстояниям и соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов, цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью "bootstrap"-анализа 1000 альтернативных деревьев.

<sup>8</sup> URL: <http://www.bacterio.net/>

### 3.4.2. Культура *Nonomuraea jabiensis* ИНА 01095

Культура была выделена из образца почвы, собранного у обочины автомобильной дороги в поселке Первомайский Московской области. Посев образца почвы проводился на органическую среду 2 Гаузе с добавлением адреналина (1 мкг/мл).

*Морфология.* Хорошо развитый ветвящийся мицелий, воздушный мицелий отсутствует. На вегетативном мицелии образуются короткие цепочки спор прямой или крючкообразной формы.

*Клеточная стенка.* В гидролизатах целых клеток культуры присутствует мезо-диаминопимелиновая кислота (мезо-ДАПК) и моносахариды ксилоза и арабиноза (II тип клеточных стенок).

*Минеральный агар 1 Гаузе.* Рост скудный. Воздушного мицелия нет. Субстратный мицелий бурый. Растворимого пигмента нет.

*Овсяный агар.* Рост хороший. Воздушного мицелия нет. Субстратный мицелий бурый. Растворимого пигмента нет.

*Органический агар 2 Гаузе.* Рост хороший. Воздушного мицелия нет. Субстратный мицелий бурый. Растворимого пигмента нет.

*Антибиотические свойства.* На агаровой среде культура активна по отношению к грамположительным бактериям и *Saccharomyces cerevisiae* ИНА S-1; при глубинном культивировании активности не обнаружено.

*Филогенетический анализ.* Выделенная культура идентифицирована согласно фенотипическим и генотипическим признакам как *Nonomuraea jabiensis*. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК депонированы в GenBank NCBI с присвоением индивидуального номера доступа KJ425225. Культура внесена в коллекцию культур ИНА (INA) под номером 01095. При помощи программы MEGA6 построена дендрограмма, отражающая

филогенетическое положение исследуемой культуры по отношению к некоторым типовым<sup>9</sup> штаммам рода *Nonomuraea* (рисунок 8).

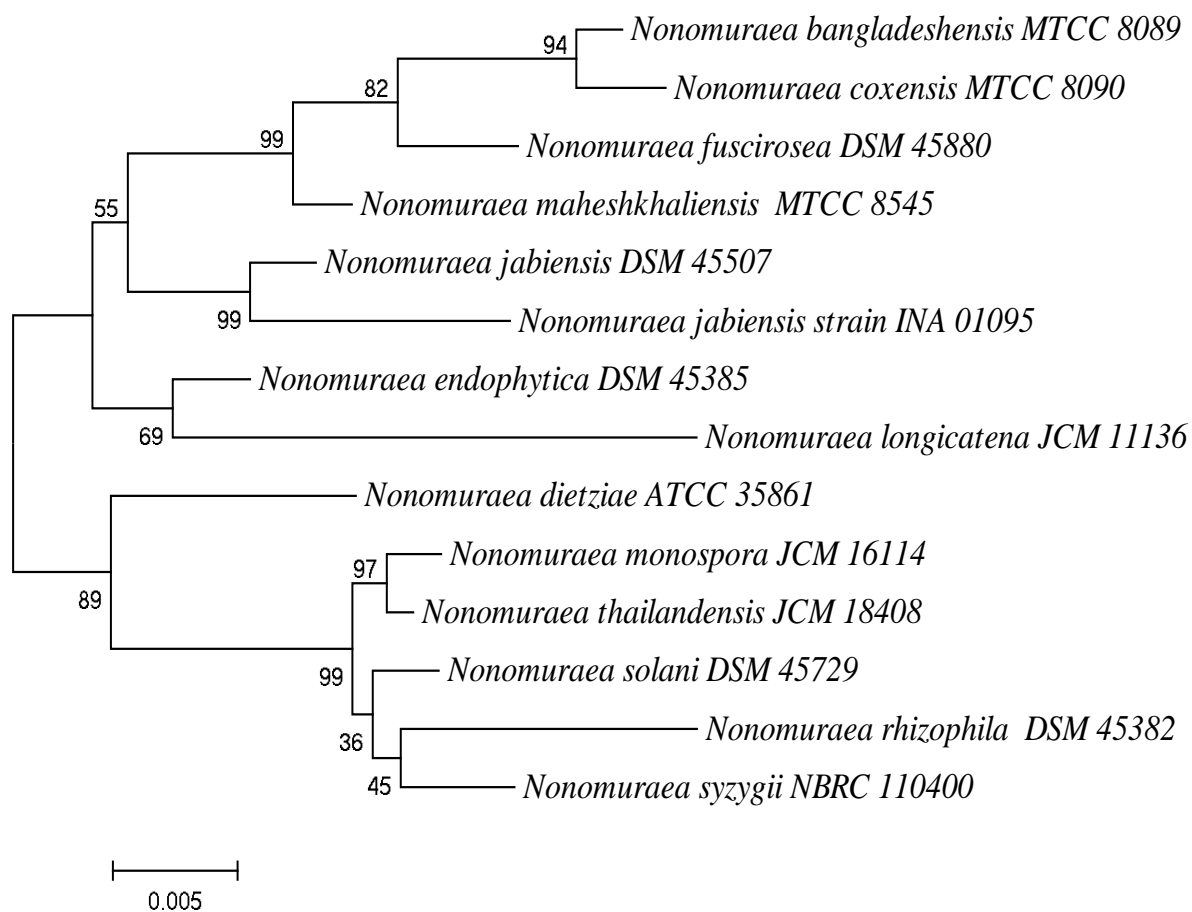


Рисунок 8. Филогенетическое дерево почвенной культуры *Nonomuraea jabiensis* INA 01095, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «ближайшего соседа» (neighbor-joining), масштаб соответствует эволюционным расстояниям и соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов, цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью "bootstrap"-анализа 1000 альтернативных деревьев.

### 3.4.3. Описание культуры *Catellatospora methionotrophica* ИНА 01096

Культура была выделена из образца почвы, собранного у обочины автомобильной дороги в поселке Первомайский Московской области. Посев образца почвы проводился на органическую среду 2 Гаузе с добавлением гетероауксина (20 мкг/мл).

<sup>9</sup> URL: <http://www.bacterio.net/>

*Морфология.* Воздушный мицелий отсутствует. На вегетативном мицелии образуются короткие цепочки неподвижных спор.

*Клеточная стенка.* В гидролизатах целых клеток культуры присутствует мезо-диаминопимелиновая кислота (мезо-ДАПК) и моносахариды ксилоза и арабиноза (II тип клеточных стенок).

*Минеральный агар 1 Гаузе.* Рост скудный. Воздушного мицелия нет. Субстратный мицелий оранжевый. Растворимого пигмента нет.

*Овсяный агар.* Рост скудный. Воздушного мицелия нет. Субстратный мицелий оранжевый. Растворимого пигмента нет.

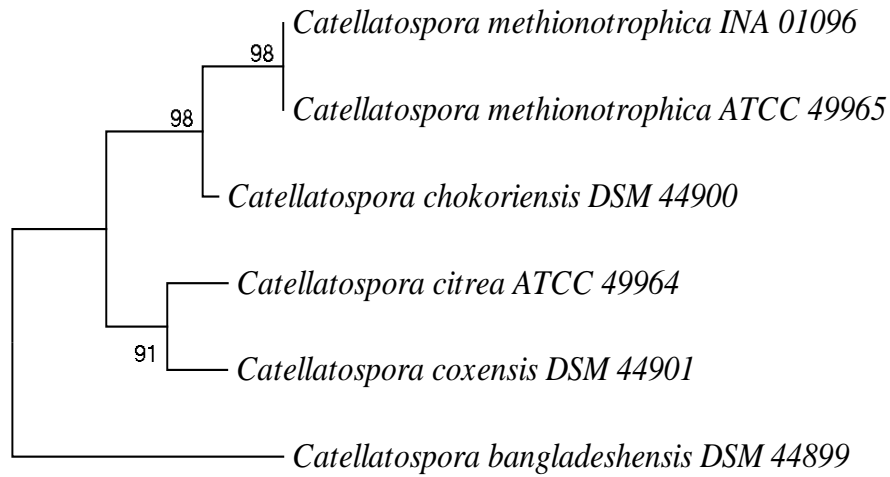
*Органический агар 2 Гаузе.* Рост скудный. Воздушного мицелия нет. Субстратный мицелий оранжевый. Растворимого пигмента нет.

*Антибиотические свойства.* На агаровой среде по отношению к изученным тест-организмам культура не активна.

*Филогенетический анализ.* Выделенная культура идентифицирована согласно фенотипическим и генотипическим признакам как *Catellatospora methionotrophica*. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК депонированы в GenBank NCBI с присвоением индивидуального номера доступа KJ425226. Культура внесена в коллекцию культур ИНА (INA) под номером 01096. При помощи программы MEGA6 построена дендрограмма, отражающая филогенетическое положение исследуемой культуры по отношению к некоторым типовым<sup>10</sup> штаммам рода *Catellatospora* (рисунок 9).

---

<sup>10</sup> URL: <http://www.bacterio.net/>



—|  
0.001

Рисунок 9. Филогенетическое дерево почвенной культуры *Catellatospora methionotrophica* INA 01096, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «ближайшего соседа» (neighbor-joining), масштаб соответствует эволюционным расстояниям и соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов, цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью "bootstrap" – анализа 1000 альтернативных деревьев.

Можно заключить, что новый метод выделения актинобактерий из почвы, в котором впервые применялись растворы адреналина (1 мкг/мл) и гетероауксина (20 мкг/мл) позволяет увеличить количество выделяемых культур порядка Actinomycetales, в том числе культур, которые считаются потенциальными продуцентами новых антибиотиков и не относятся к роду *Streptomyces* – *Micromonospora* spp., *Actinoplanes* spp., *Nonomuraea* spp. и *Catellatospora* spp. Разработанный метод также способствует увеличению количества выделяемых антибиотически активных штаммов актинобактерий. Таким образом, внесение в селективные среды биогенных аминов можно рекомендовать в качестве метода выделения из почвы актинобактерий – потенциальных продуцентов новых антибиотиков.

По результатам определения таксономического положения и антибиотическому спектру действия изученных культур были отобраны штаммы актинобактерий, перспективные для дальнейшего изыскания продуцентов антибиотиков. Данные культуры принадлежали *Streptomyces* spp., *Nonomuraea* spp. и *Actinoplanes* spp. Отобранные культуры были переданы в другие подразделения ФГБНУ НИИНА для дальнейшего изучения образуемых ими антибиотиков.



## **Глава 4. РАЗРАБОТКА НОВОГО СЕЛЕКТИВНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ЭНДОФИТНЫХ АКТИНОБАКТЕРИЙ ИЗ ЛИСТЬЕВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Перспективным источником биологически активных веществ с новыми свойствами, ценными для медицинского и биотехнологического применения в настоящее время считаются эндофиты [Strobel et al., 2006; Qin et al., 2011; Ambrose et al., 2013; Golinska et al., 2015]. В связи с этим в представленной работе был разработан селективный метод выделения актинобактерий из растений средней полосы России. Исследования были направлены на создание условий для преимущественного роста актинобактерий редких родов при выделении из листьев лекарственных растений.

Работа состояла из этапов изучения методов выделения эндофитных микроорганизмов из растений, подбора стерилизующих агентов и их концентраций для поверхностной стерилизации растений и, наконец, на основании результатов этих исследований, разработки нового селективного метода выделения актинобактерий из растений, собранных в Москве и Московской области.

### **4.1. Подбор условий выделения эндофитных актинобактерий**

На первом этапе исследований были изучены селективные методы изоляции эндофитов-актинобактерий из растений тропических лесов [Bacon, 1988; Araújo et al., 2000; Otaguro et al., 2001; Cao et al., 2004; Omarjee et al., 2004; Qin et al., 2009]. Применяя данные методы выделения эндофитов из растений, мы столкнулись с проблемой – помещенные на чашки Петри кусочки тканей растений [Omarjee et al., 2004; Qin et al., 2009] высыхали, поэтому актинобактерии не вырастали. Методы с высушиванием и измельчением тканей растений, предложенные Qin и соавторами [Qin et al., 2009], также не приводили к выделению эндофитных актинобактерий. Другой проблемой, с которой мы столкнулись, была стерилизация тканей растений –

рекомендованные вещества, их концентрации и время обработки или полностью подавляли рост эндофитной микробиоты, или не способствовали стерилизации поверхностных тканей растений от эпифитных микроорганизмов.

Решением первой проблемы стало изменение способа посева исследуемых тканей растения на чашки Петри – нарезанные кусочки листьев помещались не на чашки Петри, а в пробирки со стерильной дистиллированной водой, затем проводили посев данной суспензии, содержащей споры микроорганизмов, на твердые агаровые среды. Изменив способ посева исследуемого образца, мы решили проблему высыхания тканей растений на чашках. Для решения второй проблемы нами были исследованы несколько стерилизующих агентов с различной концентрацией и временем их стерилизации (таблица 9). Согласно данным литературы состав стерилизующих агентов, их концентрация и время действия индивидуальны для каждого образца исследуемого растения и зависят от вида растения и его морфологии. Ввиду этого для каждого исследуемого образца листьев растений состав, концентрация и время действия стерилизующего агента подбирались индивидуально, опытным путем. В результате проведенных исследований были подобраны оптимальные для всех исследуемых растений стерилизующие агенты, их концентрации и время действия, которые способствовали эффективной поверхностной стерилизации и не подавляли рост эндофитной микробиоты.

С целью увеличения количества выделяемых колоний эндофитных актинобактерий, было исследовано влияние адреналина и гетероауксина на прорастание спор эндофитных актинобактерий. В представленной работе соединения данных веществ способствовали изоляции из почвы большего количества колоний актинобактерий. По аналогии с методом выделения почвенных актинобактерий, растворы адреналина в концентрации 1 мкг/мл или гетероауксина – 20 мкг/мл были добавлены в питательную среду, на которые проводился высев суспензии листьев. Количество выделенных колоний эндофитных актинобактерий не отличалось от контроля.

Таблица 9. Стерилизующие растворы, которые применялись для выделения эндофитных актинобактерий из растений средней полосы России.

концентрация стерилизу- ющего агента	время обработки растительных образцов, минут				
	1	3	5	10	20
этанол					
70%	+	+	+	+	+
75%	+	+	+	+	+
80%	+	+	+	+	+
96%	+	+	+	+	–
гипохлорит натрия					
0,9%	+	+	+	+	+
1%	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	+
5%	+	+	+	+	+
10%	+	+	+	+	–
перекись водорода					
10%	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+
30%	+	+	+	+	–

Примечание: «+» – проводился эксперимент; «–» – эксперимент не проводился.

Проанализировав приведенные в литературе данные, мы пришли к предположению, что растворы биогенных аминов с целью стимуляции прорастания большего количества спор актинобактерий возможно использовать для предобработки листьев после промывки от стерилизующих агентов. Для проверки нашей гипотезы была проведена серия экспериментов по подбору концентрации биогенных аминов и времени обработки растительных тканей. Нужно отметить, что растворы адреналина и гетероауксина с данной целью применялись впервые.

В результате проведенных экспериментов было установлено время обработки растительных образцов – 20 минут, и определена концентрация действия гетероауксина – 20 мкг/мл, которая приводила к увеличению количества выросших колоний в 2,56 раза по сравнению с контролем.

Применение адреналина для обработки листьев в концентрациях 0,1, 0,5, 1 и 1,5 мкг/мл в течение 10-20 минут не дало видимого эффекта и количество выросших колоний не отличалось от контроля (таблица 10).

Таблица 10. Результаты применения гетероауксина (20 мкг/мл) и адреналина (1 мкг/мл) для выделения актинобактерий из листьев лекарственных растений.

Раствор для предобработки	$\frac{\text{КОЕ эндофитных актинобактерий}}{\text{г растительной ткани}} \times 10^3$	
	Кол-во	%
Контроль	25±0,24	22
Адреналин (1 мкг/мл)	26±0,25	22
Гетероауксин (20 мкг/мл)	64±0,61	56
Всего	115±1,09	100

*Примечание.* КОЕ – количество колониеобразующих единиц.

Поскольку гетероауксин способствовал увеличению колоний эндофитных актинобактерий по сравнению с контролем, а адреналин – нет, представляло интерес найти другое вещество, стимулирующее прорастание спор эндофитных актинобактерий. Так как гетероауксин является фитогормоном, было решено использовать соединение растительного происхождения – циркон, который влияет на активизацию биохимических процессов в клетках. Для выделения эндофитных актинобактерий циркон применялся впервые. В результате проведенных экспериментов по подбору концентрации действия данного соединения было установлено, что циркон в концентрации 1 мкг/мл увеличивает количество выделяемых колоний актинобактерий по сравнению с контролем.

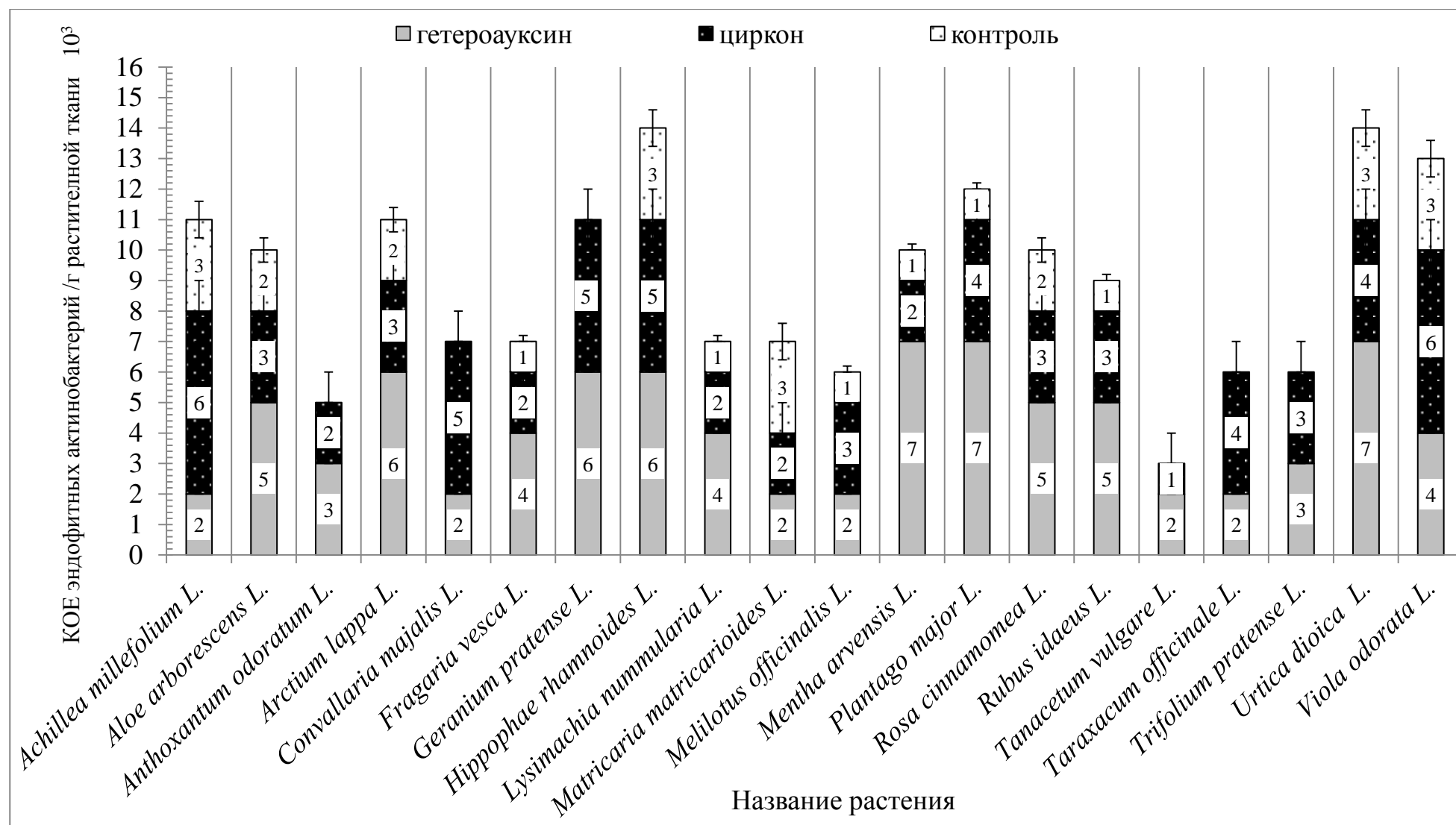
Результаты применения гетероауксина и циркона для выделения актинобактерий-эндофитов из листьев лекарственных растений представлены в таблице 11. Исходя из данных таблицы, предобработка тканей растений гетероауксином способствует увеличению количества выросших колоний актинобактерий в 3,1 раза, циркона – в 2,7 раза по сравнению с контролем.

Таблица 11. Результаты применения гетероауксина и циркона для выделения актинобактерий-эндофитов из листьев лекарственных растений.

Раствор для предобработки	КОЕ эндофитных актинобактерий г растительной ткани $\times 10^3$	
	Кол-во	%
Контроль	27±0,2	15
Циркон (1 мкг/мл)	68±0,51	38
Гетероауксин (20 мкг/мл)	84±0,63	47
Всего	179±1,34	100

*Примечание.* КОЕ – количество колониеобразующих единиц.

В проведенных экспериментах наибольшее количество выросших на чашках Петри колоний актинобактерий было из листьев облепихи (*Hipporhae rhamnoides*) и крапивы двудомной (*Urtica dioica*), наименьшее количество – из пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare*) (рисунок 10). Следует отметить, что после предобработки листьев гетероауксином и цирконом удалось выделить актинобактерии из всех 20 растений, в то время как в контроле актинобактерии были выделены только из 14 растений (рисунок 10).



Примечание: достоверность различий соответствует  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 10. Количество колоний актинобактерий, выделенных на чашки Петри из листьев лекарственных растений.

Таким образом, был разработан новый селективный метод выделения актинобактерий-эндофитов из листьев растений, состоящий из поверхностной стерилизации листьев от эпифитных микроорганизмов 75% этанолом в течение 5 минут и 1% раствором гипохлорита натрия (NaOCl) в течение 20 минут; промывкой растительных тканей от стерилизующих агентов; предобработкой растительных образцов 10% раствором гидрокарбоната натрия (NaHCO<sub>3</sub>) в течение 5 – 10 минут в зависимости от растительной ткани для подавления роста эндофитных грибов и последующей предобработкой исследуемых образцов гетероауксином (20 мкг/мл) и цирконом (1 мкг/мл) в течение 20 минут с целью стимуляции прорастания спор эндофитных актинобактерий на чашках Петри. Новизна метода состоит в том, что впервые были использованы растворы циркона (смеси гидроксикоричных кислот) и гетероауксина (индолил-3-уксусной кислоты) для предобработки поверхностно стерилизованных листьев. Предобработка вышеуказанными растворами позволяет выделять большее количество колоний эндофитных актинобактерий на чашки Петри. В разработанном методе впервые была приготовлена водная суспензия из листьев исследуемых растений, которая впоследствии высевалась на чашки Петри. В совокупности описанные приемы позволили выделить эндофитные актинобактерии из всех образцов растений.

#### **4.2. Определение таксономического положения выделенных актинобактерий-эндофитов**

Большинство колоний эндофитных актинобактерий удалось выделить благодаря предобработке изучаемых образцов листьев биологически активными соединениями – гетероауксином и цирконом (таблица 12). Около 80% выросших на чашках колоний были выделены в чистую культуру после обработки листьев гетероауксином, так как характеризовались лучшим ростом. В контрольных образцах и после предобработки цирконом в чистую культуру выделено 59% и 54% соответственно.

Таблица 12. Количество штаммов, выделенных в чистую культуру.

№ п/п	Название растения	Количество штаммов			Всего штаммов
		Контроль	Циркон	Гетероауксин	
1	<i>Achillea millefolium</i> L.	–	1	2	3
2	<i>Aloe arborescens</i> L.	2	3	5	10
3	<i>Anthoxantum odoratum</i> L.	–	1	1	2
4	<i>Arctium lappa</i> L.	1	3	6	10
5	<i>Convallaria majalis</i> L.	–	1	2	3
6	<i>Fragaria vesca</i> L.	1	2	4	7
7	<i>Geranium pratense</i> L.	–	1	1	2
8	<i>Hippophae rhamnoides</i> L.	3	5	6	14
9	<i>Lysimachia nummularia</i> L.	1	2	4	7
10	<i>Matricaria matricarioides</i> L.	–	1	1	2
11	<i>Melilotus officinalis</i> L.	–	–	2	2
12	<i>Mentha arvensis</i> L.	1	2	4	7
13	<i>Plantago major</i> L.	1	4	7	12
14	<i>Rosa cinnamomea</i> L.	2	3	5	10
15	<i>Rubus idaeus</i> L.	1	1	5	7
16	<i>Tanacetum vulgare</i> L.	–	1	–	1
17	<i>Taraxacum officinale</i> L.	–	1	2	3
18	<i>Trifolium pratense</i> L.	–	–	1	1
19	<i>Urtica dioica</i> L.	3	4	7	14
20	<i>Viola odorata</i> L.	–	1	2	3
Всего штаммов		16	37	67	120

Примечание. «–» – штаммы не выделились.

Для определения таксономического положения выделенных культур актинобактерий-эндофитов мы изучили их фенотипические и геносистематические признаки. Результаты таксономической идентификации штаммов представлены в таблице 13.



Таблица 13. Таксономическое положение культур эндофитных актинобактерий, выделенных из листьев лекарственных растений.

Селективный агент	Количество штаммов			
	<i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Nocardiosis</i>	Неидентиф. роды
Контроль	9	4	2	1
Циркон (1 мкг/мл)	24	9	1	3
Гетероауксин (20 мкг/мл)	41	20	5	1

*Примечание.* Неидентиф. роды – группа штаммов, которые не идентифицированы в связи с потерей их жизнеспособности.

Исходя из данных таблицы 13, культуры *Streptomyces* spp. были преобладающими среди выделенных из растительных тканей культур актинобактерий, что согласуется с многочисленными данными литературы [Bérdu, 2005; Qin et al., 2009; Qin et al., 2011; Ambrose et al., 2011; Huang et al., 2012; Gangwar et al., 2014; Golinska et al., 2015]. Предобработка растительных тканей гетероауксином способствует увеличению количества выделяемых культур рода *Streptomyces* в 4,5 раза, цирконом – в 2,6 раза.

Исследования установили, что предобработка листьев лекарственных растений гетероауксином и цирконом приводит к увеличению выделяемых культур *Micromonospora* spp.: после обработки гетероауксином в 5 раз, цирконом – 2,25 раза по сравнению с контролем. В процессе работы некоторые штаммы теряли свою жизнеспособность после нескольких пересевов, вследствие чего их таксономическое положение определить не удалось (таблица 13).

Нужно отметить что, предобработка листьев цирконом не оказывала видимого влияния на выделение культур редких родов актинобактерий, не относящихся к *Micromonospora* spp., по сравнению с контролем, в то время как предобработка гетероауксином дала значительный эффект (таблица 13). У

штаммов эндофитных актинобактерий, не относящихся к *Micromonospora* spp., были изучены нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК.

Результаты изучения генотипических признаков редких культур актинобактерий-эндофитов показали, что отобранные 8 штаммов принадлежат разным видам рода *Nocardiosis*: *N. sp.*, *N. umidischolae*, *N. viridoflava*, *N. tropica*, *N. dassonvillei*, *N. exhalans* и *N. quinghaiensis* (2 штамма). Культуры были внесены в коллекцию микроорганизмов ИНА, а их нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК депонированы в международную базу данных GenBank NCBI с присвоением индивидуальных номеров доступа.

В результате изучения фенотипических и геносистематических признаков выделенных штаммов установлено, что 74 культуры (61,6%) принадлежат *Streptomyces* spp., 33 культуры (27,5%) – *Micromonospora* spp. и 8 культур (6,7%) были отнесены к *Nocardiosis* spp.

Таким образом, предобработка исследуемых образцов стимуляторами прорастания спор, не только увеличивает количество выделяемых эндофитных культур редких родов, но и способствует выделению редко изолируемых эндофитных культур *Nocardiosis* spp. Этот метод оказался успешным для направленного выделения культур *Micromonospora* spp.

#### **4.3. Изучение антагонистических свойств культур эндофитных актинобактерий, выделенных из листьев растений**

Среди выделенных 120 культур эндофитных актинобактерий был проведен отбор перспективных штаммов для изыскания антибиотиков. Изучение антибиотической активности штаммов эндофитных актинобактерий показало, что предобработка листьев цирконом (1 мкг/мл) и/или гетероауксином (20 мкг/мл) способствует выделению большего количества антибиотически активных культур по сравнению с контролем (таблица 14). Наиболее эффективной для увеличения количества выделенных антибиотически активных штаммов оказалась обработка растительных тканей гетероауксином.

Таблица 14. Количество антибиотически активных штаммов актинобактерий-эндофитов, выделенных из листьев лекарственных растений

Селективный агент	Количество изученных культур							
	всего		Активные в отношении грамположительных бактерий		Активные в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий		Активные в отношении дрожжеподобных грибов	
	Число	%	Число	%	Число	%	Число	%
Контроль	16±0,12	100	12±0,09	75	–	–	4±0,03	25
Циркон	37±0,28	100	34±0,26	92	4±0,03	11	9±0,068	24
Гетероауксин	67±0,51	100	56±0,42	84	7±0,05	10	23±0,17	34

*Примечание:* грамположительные тест-бактерии: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633;

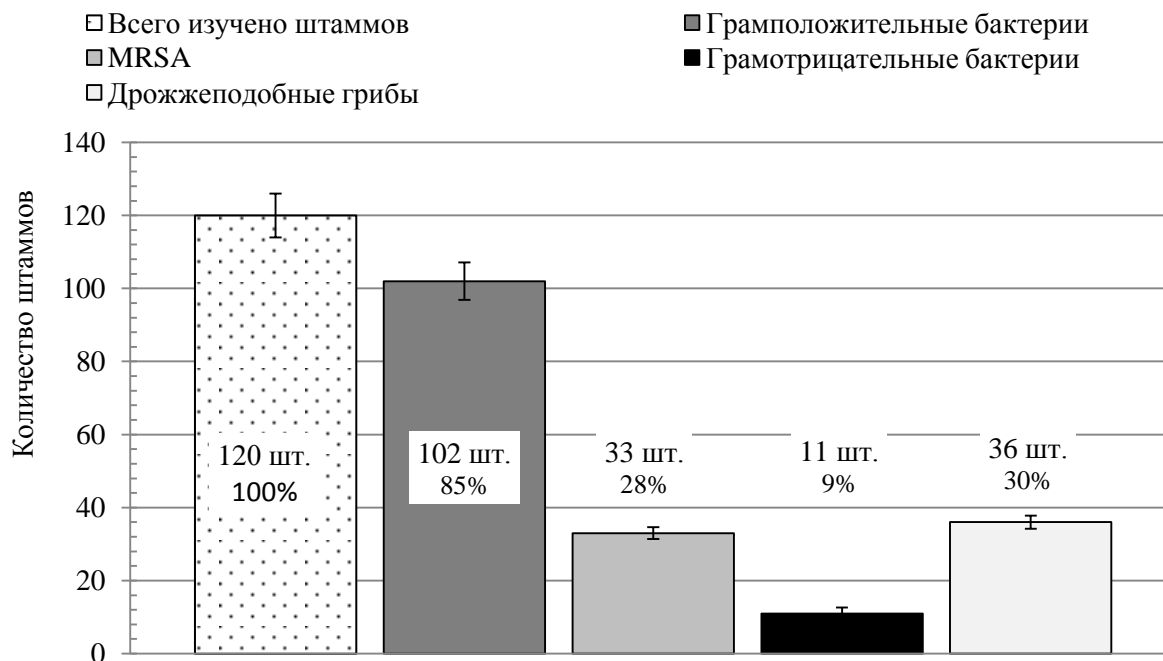
граммотрицательные тест-бактерии: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;

дрожжеподобные грибы: *Saccharomyces cerevisiae* ИНА S-1.

Предобработка растительных тканей селективными агентами способствовала выделению большего количества антибиотически активных штаммов эндофитных актинобактерий в отношении грамположительных тест-бактерий, включая метициллинорезистентного стафилококка (MRSA): после предобработки цирконом количество антибиотически активных штаммов было больше в 1,2 раза по сравнению с контролем, а после предобработки гетероауксином – в 1,12 раз по сравнению с контролем (таблица 14).

Результаты изучения антибиотической активности всех выделенных культур на агаровых средах показали, что способностью подавлять рост грамположительных тест-бактерий обладали 102 культуры (85%) из 120 изученных штаммов, включая активных в отношении MRSA – 33 штамма (28%). Подавляли рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий – 11 культур (9%). Активными в отношении дрожжеподобных грибов

были 36 культур (30%) (рисунок 11). Стоит отметить, что предобработка листьев гетероауксином и цирконом позволила выделить культуры, которые обладают широким спектром действия, в то время как в контроле таких культур выделено не было (таблица 14).



*Примечание:* MRSA – метициллинорезистентный *S. aureus* ИНА 00761. Достоверность различий соответствует  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 11. Количество штаммов эндофитных актинобактерий, активных в отношении тест-микробов.

Таким образом, разработанный метод выделения эндофитных актинобактерий из листьев лекарственных растений с использованием гетероауксина и циркона позволил увеличить количество выделенных культур актинобактерий, обладающих антибиотической активностью на агаровых средах по отношению к грамположительным и грамотрицательным тест-бактериям, а также дрожжеподобным грибам. Предобработку растительных тканей гетероауксином и цирконом можно рекомендовать в качестве метода выделения из растений эндофитных актинобактерий – продуцентов антибиотиков, активных в отношении грамположительных тест-бактерий, включая метициллинорезистентного стафилококка (MRSA), и грамотрицательных тест-бактерий.

#### 4.4. Описание редких культур эндофитных актинобактерий

По результатам изучения фенотипических и хемотаксономических признаков было отобрано 8 культур, отличающихся по таксономическим признакам от представителей родов *Streptomyces* и *Micromonospora*. Данные культуры были выделены из листьев следующих растений: *Aloe arborescens* (штаммы 15EA, 19EA, 20EA), *Mentha arvensis* (штаммы 85EA, 89EA), *Lysimachia nummularia* (90EA), *Fragaria vesca* (97EA), *Arctium lappa* (109EA) и имели схожие морфологические, культуральные и хемотаксономические признаки. Все 8 штаммов имели следующие признаки.

*Морфология.* Хорошо развитый ветвящийся мицелий. На вегетативном мицелии образуются длинные цепочки спор прямой и зигзагообразной формы.

*Клеточная стенка.* В гидролизатах целых клеток культур присутствует мезо-диаминопимелиновая кислота (мезо-ДАПК), диагностические сахара отсутствуют (III тип клеточных стенок).

*Минеральный агар 1 Гаузе.* Рост скудный. Воздушный мицелий отсутствует. Субстратный мицелий кремового цвета. Растворимого пигмента нет.

*Овсяный агар.* Рост скудный. Воздушный мицелий отсутствует. Субстратный мицелий кремового цвета. Растворимого пигмента нет.

*Органический агар 2 Гаузе.* Рост хороший. Воздушный мицелий отсутствует. Субстратный мицелий бурого цвета. Растворимого пигмента нет.

*Антибиотические свойства.* Культуры активны в отношении грамположительных бактерий и дрожжеподобных грибов.

*Филогенетический анализ.* Выделенные культуры эндофитных актинобактерий идентифицированы согласно фенотипическим и генотипическим признакам как различные виды рода *Nocardopsis*: *N. sp.*, *N. umidischolae*, *N. viridoflava*, *N. tropica*, *N. exhalans*, *N. dassonvillei* и *N. quinghaiensis* (2 штамма). Культуры внесены в коллекцию культур ИНА, а

нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК культур депонированы в базу данных GenBank NCBI с присвоением индивидуальных номеров доступа: ИНА 01099 – KJ425228, ИНА 01100 – KJ425229, ИНА 01101 – KJ425230, ИНА 0110 – KJ425231, ИНА 01103 – KJ425232, ИНА 01104 – KJ425233, ИНА 01097 – KJ425227, ИНА 01105 – KJ425234.

При помощи программы MEGA6 построено филогенетическое дерево исследуемых культур (рисунок 12).

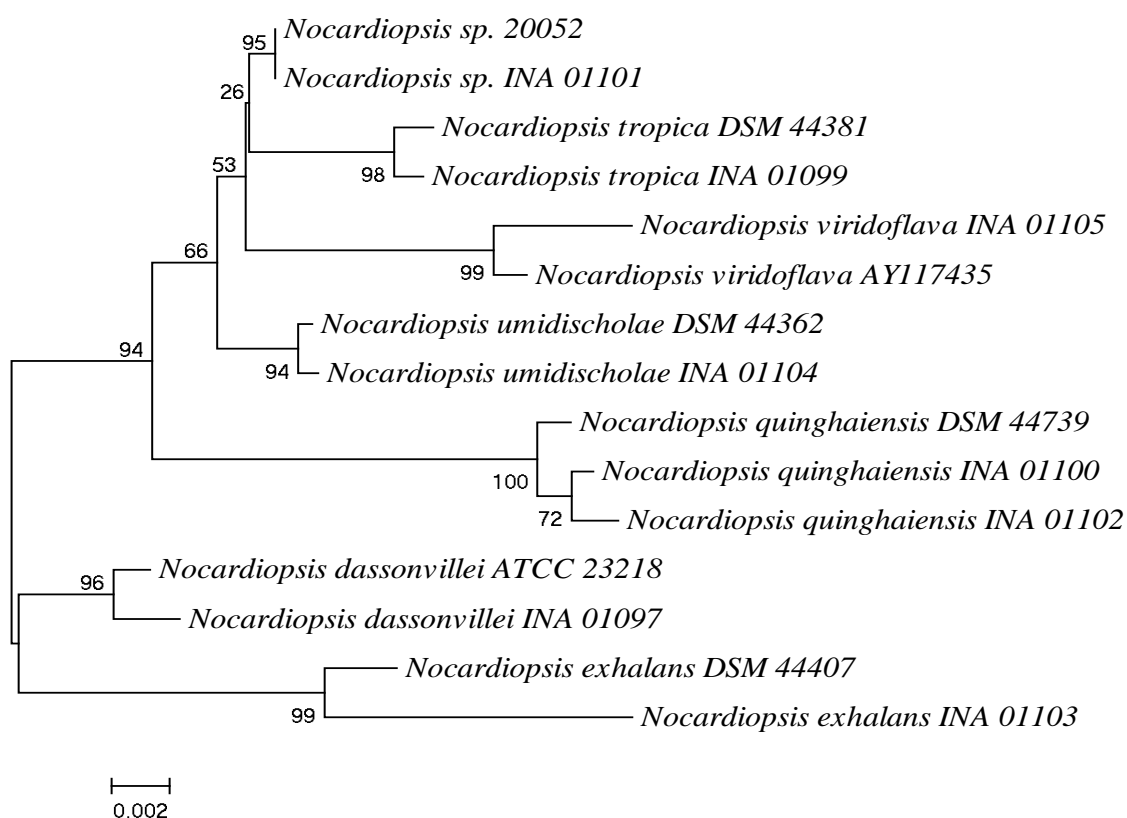


Рисунок 12. Филогенетическое дерево выделенных из листьев лекарственных растений актинобактерий-эндофитов, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «ближайшего соседа» (neighbor-joining), масштаб соответствует эволюционным расстояниям и соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов, цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью "bootstrap"-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Можно заключить, что новый метод выделения эндофитных актинобактерий способствовал выделению эндофитных микроорганизмов из листьев растений средней полосы России. Новизна метода состоит в том, что впервые были использованы растворы циркона (смесь гидроксикоричных кислот) и гетероауксина (калиевая соль индолил-3-уксусной кислоты) для предобработки поверхностно стерилизованных листьев, а также в приготовлении водной суспензии из листьев. Разработанный метод позволяет выделять большее количество культур эндофитных актинобактерий, в том числе культур редких родов, и способствует выделению большего количества культур актинобактерий, обладающих антибиотической активностью на агаровых средах по отношению к грамположительным и грамотрицательным тест-бактериям, а также дрожжеподобным грибам. Предобработку растительных тканей гетероауксином и цирконом можно рекомендовать в качестве метода выделения из растений эндофитных актинобактерий – продуцентов антибиотиков, активных в отношении грамположительных тест-бактерий, включая метициллинорезистентного стафилококка (MRSA), и грамотрицательных тест-бактерий.

По результатам определения таксономического положения и антибиотическому спектру действия изученных культур были отобраны штаммы эндофитных актинобактерий, перспективные для дальнейшей работы по изысканию продуцентов антибиотиков. Данные культуры принадлежали *Streptomyces* spp. и *Nocardiosis* spp. Отобранные культуры были переданы в Сектор природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий (зав. О. Е. Ефременкова) для дальнейшего изучения образуемых ими антибиотиков.

## Глава 5. ИНДУКЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ АНТИБИОТИКОВ ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ШТАММОВ РЕДКИХ РОДОВ АКТИНОБАКТЕРИЙ

При первичном скрининге штаммов-антагонистов, выделенных из природных источников, антибиотические свойства в отношении набора тест-бактерий проверяются на агаровых средах, затем проводят культивирование продуцентов на жидких питательных средах с целью химического выделения антибиотика, а также микробиологических и химических исследований по определению антибиотического вещества [Гаузе, 1961]. Однако на практике значительная часть активных на агаровых средах штаммов оказывается биологически неактивной при глубинном культивировании на жидких питательных средах, в связи с чем дальнейшее их изучение не проводится. Из источников литературы известно, что большинство актинобактерий могут синтезировать антибиотики, для этого необходимо подобрать условия культивирования, обеспечивающие биосинтез антибиотика [Гаузе, 1961; Малкина, 1998].

Нами были проведены исследования культур редких родов актинобактерий, которые представляют интерес как потенциальные продуценты новых антибиотических веществ с целью подбора условий индукции биосинтеза антибиотиков. Для исследований было отобрано 15 штаммов актинобактерий (6 штаммов почвенных и 9 штаммов эндофитных актинобактерий), которые на основании результатов изучения фенотипических признаков принадлежали к культурам редких родов порядка Actinomycetales – *Nonomuraea* spp., *Nocardiosis* spp. и *Actinoplanes* spp.; на основании изучения антибиотических свойств на агаровых средах отобранные штаммы были активны в отношении грамположительных тест-бактерий, включая MRSA.



## 5.1. Условия глубинного культивирования отобранных культур актинобактерий

Биосинтез антибиотиков при глубинном культивировании отобранных штаммов актинобактерий проводился на следующих жидких питательных средах<sup>11</sup> – органическая среда 2 Гаузе с мелом, среда А<sub>4</sub>, среда 330, среда 6613, среда 2663, среда 5339, среда 11654, среда «сах», среда «тобрекс», среда «мальтексная». Культуры выращивались в колбах Эрленмейера при постоянном качании при 28°C.

Определение антибиотического спектра действия культуральной жидкости исследуемых штаммов проводили каждые 48 часов методом диффузии в органический агар 2 Гаузе с использованием лунок по отношению к грамположительным тест-бактериям – *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; грамотрицательным тест-бактериям – *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и дрожжеподобным грибам – *Saccharomyces cerevisiae* ИНА S-1. Суспензия тест-бактерий для посева на чашки Петри содержала 10<sup>7</sup> – 10<sup>9</sup> КОЕ микроорганизмов/мл. Суспензию каждого штамма тест-бактерии засеивали «газоном» на чашку Петри. В лунки вносили по 100 мкл культуральной жидкости исследуемого штамма. Затем чашки помещали в термостат при температуре 28°C на 48 часов, после чего по зонам подавления роста тест-бактерий устанавливали антибиотический спектр действия изучаемого штамма. Диаметр зон угнетения роста тест-микробов измеряли при помощи линейки с точностью до 1 мм.

В результате проведенных исследований было установлено, что отобранные культуры не проявляют активности при глубинном культивировании. Ввиду того, что антибиотические вещества отобранных культур представляют большой интерес, была поставлена задача подбора

---

<sup>11</sup> состав питательных сред приведен в приложении «Состав питательных сред».

условий индукции антибиотикообразования у культур редких родов актинобактерий.

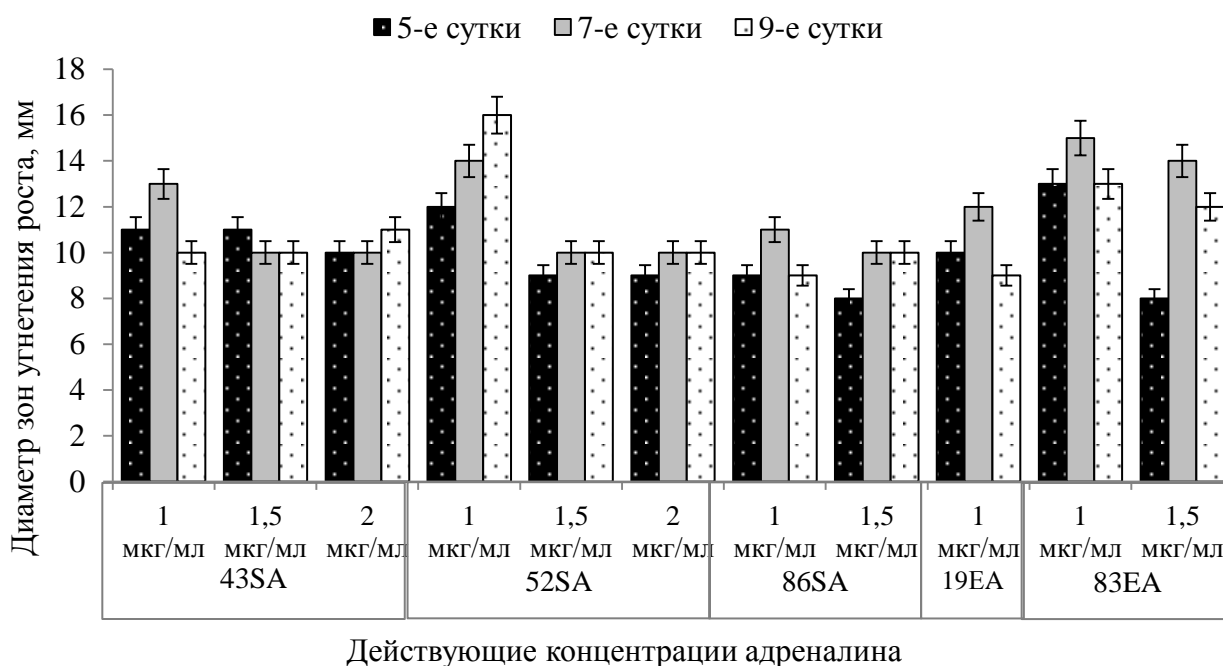
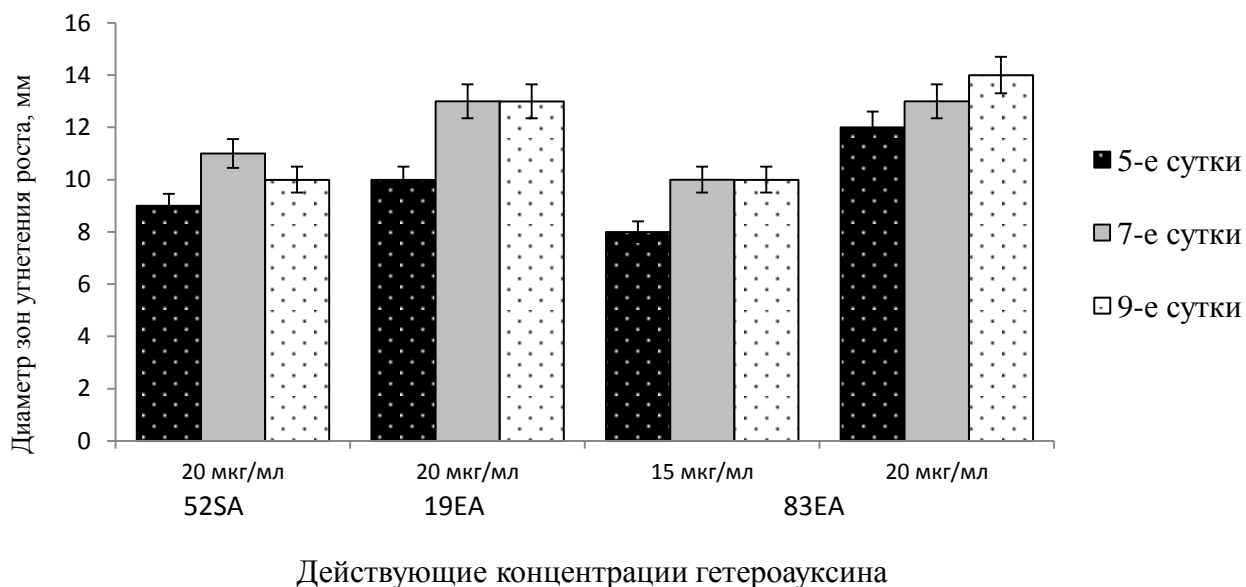
## **5.2. Подбор условий биосинтеза антибиотиков при глубинном культивировании актинобактерий**

Известно, что индуцировать образование антибиотиков у актинобактерий возможно посредством ауторегуляторов – физиологически активных соединений различной химической природы. Эти соединения играют сигнальную роль в изменении количественного (скорость роста) или качественного (цитодифференцировка) состояния микробной культуры [Черногор, Винников, 2004]. Образуемые эукариотическими и прокариотическими микроорганизмами ауторегуляторы составляют большую группу природных соединений, различающихся по строению и выполняемым функциям [Хохлов, 1988; Черногор, Винников, 2004]. В качестве ауторегуляторов могут выступать триспорные кислоты (А, В, С), d-фактор, гормоны, вторичные метаболиты [Хохлов, 1979; Duntze et al., 1973; Черногор, Винников, 2004; Ефременкова, 2016]. Помимо ауторегуляторов инициации биосинтеза антибиотиков способствует мутагенная обработка неактивных культур этидием бромидом, антибиотиком даунорубицином, метилнитронитрозогуанидином [Малкина, 1998].

Для выполнения поставленной задачи по подбору условий индукции биосинтеза антибиотиков у отобранных культур актинобактерий нам было необходимо подобрать ауторегуляторы, которые влияли бы на метаболические процессы в микробных клетках актинобактерий и посредством которых активизировался бы биосинтез антибиотических веществ. Известно, что адреналин и гетероауксин представляют собой биологически активные соединения животного (адреналин) и растительного (адреналин, гетероауксин) происхождения, которые активизируют биохимические процессы, регулируют метаболические и энергетические процессы в клетках [Рощина, 2010; Herbert et al., 1964]. В исследованиях представленной диссертационной работы

установлено, что вышеуказанные соединения оказывают стимулирующее действие на прорастание спор актинобактерий при выделении их из почвенных и растительных образцов, а также способствуют выделению большего количества антибиотически активных штаммов актинобактерий из природных источников. Опираясь на полученные результаты по влиянию адреналина и гетероауксина на прорастание спор актинобактерий, нами было сделано предположение, что данные соединения могут также влиять на экспрессию и генов и метаболические пути биосинтеза антибиотиков у актинобактерий. Ввиду этого была поставлена задача изучения влияния адреналина и гетероауксина на индукцию биосинтеза антибиотиков штаммами редких родов актинобактерий при выращивании на жидких питательных средах. Данные исследования проводились в несколько этапов: подбор оптимальных концентраций действия биогенных аминов, определение чувствительности тест-бактерий к адреналину и гетероауксину и изучение влияния биогенных аминов на индукцию антибиотикообразования культурами редких родов актинобактерий.

Сначала нами были подобраны оптимальные концентрации действия биогенных аминов на органической среде 2 Гаузе с мелом в отношении грамположительной тест-бактерии *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Раствор адреналина брали в концентрациях 0,5, 1, 1,5 и 2 мкг/мл, гетероауксина – 5, 10, 15, 20 и 25 мкг/мл. Растворы биогенных аминов добавляли в жидкие питательные среды с первого дня культивирования актинобактерий, пропуская через стерильный мембранный фильтр диаметром пор 0,22 мкм во избежание контаминации культуральной жидкости. После культивирования исследуемых актинобактерий на жидких средах с биологически активными веществами в концентрациях адреналина – 1, 1,5 и 2 мкг/мл, гетероауксина – 15 и 20 мкг/мл на 5-9 сутки у некоторых культур наблюдалось появление антибактериального действия в отношении *M. luteus* ATCC 9341. В контроле исследуемые штаммы были неактивны (рисунок 13).



*Примечание:* SA – почвенные актинобактерии; EA – эндофитные актинобактерии. Неактивные культуры были исключены из диаграмм. Достоверность различий соответствует  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 13. Зоны подавления роста *Micrococcus luteus* ATCC 9341 штаммами редких родов актинобактерий, культивируемых на жидкой питательной среде 2 Гаузе с мелом.

Диаграммы на рисунке 13 отражают результаты проведенных экспериментов по подбору оптимальных концентраций адреналина и гетероауксина, при которых было индуцировано образование антибиотических

веществ у культур редких родов актинобактерий на жидкой питательной среде 2 Гаузе с мелом в отношении *M. luteus* ATCC 9341. В результате проведенной серии экспериментов были подобраны оптимальные концентрации действия адреналина – 1 мкг/мл и гетероауксина – 20 мкг/мл.

Появление антибактериального действия у исследуемых штаммов при культивировании на жидких питательных средах с добавлением биогенных аминов может быть связано с двумя факторами – чувствительностью тест-бактерий к растворам адреналина и/или гетероауксина или индукцией образования антибиотиков биогенными аминами. Для того, чтобы понять за счет каких факторов наблюдалось появление антибиотической активности, была изучена чувствительность тест-бактерий к адреналину и гетероауксину.

Изучение чувствительности тест-бактерий к растворам биогенных аминов проводили методом градиентных пластин. В стерильные чашки Петри, поставленные наклонно, наливали слой органического агара 2 Гаузе. После того, как застывал нижний слой агара, чашку ставили в горизонтальное положение и наливали второй слой питательного агара, содержащего раствор биогенного амина (биомедиатора): адреналина в концентрациях 1, 1,5, 2 мкг/мл и/или гетероауксина – 15 и 20 мкг/мл. В качестве контроля служили чашки с двумя слоями агара без растворов биомедиаторов. На поверхность агара наносили суспензию спор изучаемого организма в виде штриха по направлению к краю чашки с наибольшей концентрацией раствора адреналина или гетероауксина. Чашки инкубировали при 28°C в течение 5 – 7 суток, после чего определяли антибактериальное действие изучаемых биогенных аминов в отношении используемых тест-бактерий. Опыты проводили в трехкратной повторности. Исследования показали, что адреналин и гетероауксин не оказывают антибактериального действия на культуры тест-бактерий.

Ввиду того, что антибактериальная активность у биогенных аминов не была обнаружена, влияние внесенных в питательную среду биомедиаторов нельзя объяснить их антибиотическим действием на тест-бактерии.

Можно заключить, что, по-видимому, внесение биогенных аминов инициирует биосинтез антибиотических веществ у некоторых культур актинобактерий. Полученные результаты предполагают возможность применения адреналина и гетероауксина в качестве ауторегуляторов индукции образования антибиотиков у культур редких родов актинобактерий.

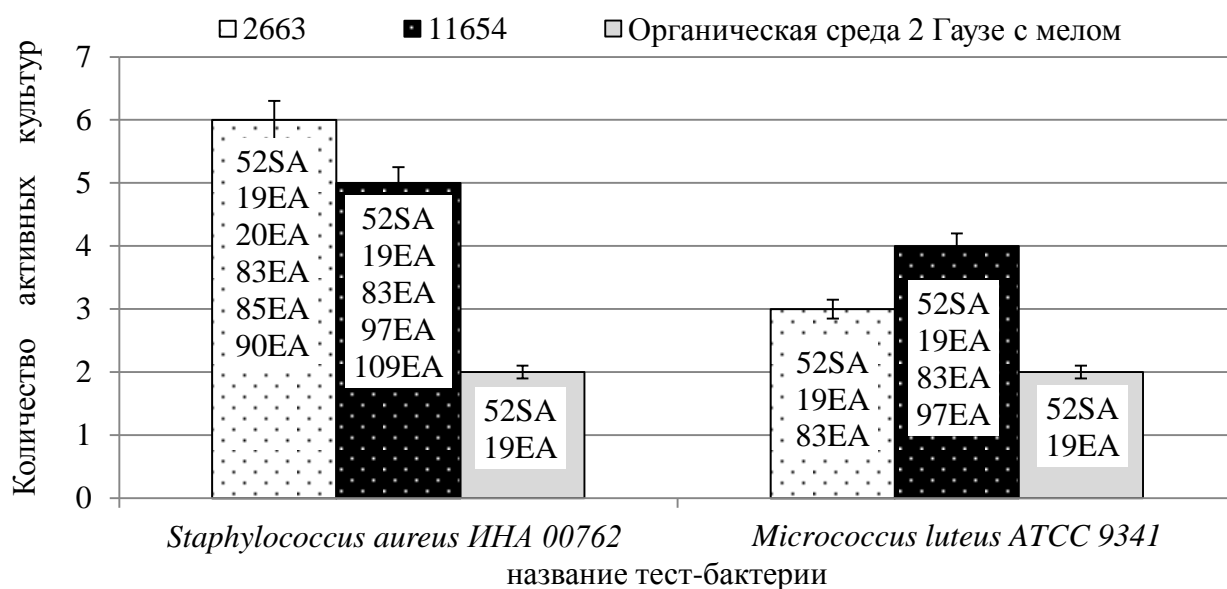
### **5.3. Индукция образования антибиотиков штаммами редких родов актинобактерий**

На следующем этапе работы нами были проведены опыты по индукции биосинтеза антибиотических веществ отобранными культурами актинобактерий *Actinoplanes* spp., *Nocardiosis* spp. и *Nonomuraea* spp. Штаммы актинобактерий выращивали на вышеперечисленных жидких питательных средах\* с добавлением растворов адреналина (1 мкг/мл) и гетероауксина (20 мкг/мл) с первого дня культивирования.

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что у 8 отобранных штаммов актинобактерий из 15-ти при ферментации на жидких питательных средах с добавлением биогенных аминов инициируется образование антибиотических веществ, активных в отношении грамположительных тест-бактерий *Staphylococcus aureus* ИНА 00762 и *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Угнетение роста грамположительных тест-бактерий наблюдалось при выращивании культур на следующих питательных средах: жидкая органическая среда 2 Гаузе, среда 2663 и среда 11654 (рисунок 14).

---

\* перечень жидких питательных сред представлен в главе 5.1.



*Примечание:* в диаграмме указаны номера антибиотически активных штаммов на жидкой питательной среде. Достоверность различий соответствует  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 14. Результаты изучения индукции антибиотикообразования неактивными культурами актинобактерий редких родов на различных жидких питательных средах.

Таким образом, добавление адреналина и гетероауксина в жидкие питательные среды при глубинном культивировании актинобактерий инициирует биосинтез антибиотиков у некоторых штаммов актинобактерий редких родов.

## **Глава 6. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗУЧЕНИЯ АКТИНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДВУХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ – ПОЧВЫ И ЛИСТЬЕВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Актинобактерии широко распространены в природе. Основным источником выделения актинобактерий является почва, где они играют существенную роль в процессах почвообразования из-за их способности разлагать труднодоступные для других бактерий органические вещества и синтезировать биологически активные соединения [Бабич, 1997; Babalola et al., 2009; Adegboye et al., 2012; Sripreechasak et al., 2013]. Наряду с почвой актинобактерии широко представлены и в растительных тканях [Зенова, 1998], преимущественно в корнях и листьях растений [Zinnel et al., 2002; Posada et al., 2005; Miller et al., 2012].

Разработка новых селективных методов выделения актинобактерий для поиска среди них продуцентов новых антибиотиков проводилась нами из образцов почв и листьев лекарственных растений. Так как выделение актинобактерий проводили из двух разных экологических систем, представляло интерес сравнить полученные результаты исследований таксономического разнообразия и антибиотической активности актинобактерий двух экосистем.

### **6.1. Сопоставление таксономического разнообразия актинобактерий почвы и растений.**

Выделенные из почвы и листьев растений штаммы актинобактерий относились к родам *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Micromonospora*, *Nocardiosis*, *Nonomuraea* и *Streptomyces*. Как видно из таблицы 15 из образцов почв было выделено в 12,5 раз больше штаммов и обнаружено большее разнообразие родов актинобактерий по сравнению с растительными образцами. Это связано, в первую очередь, с количеством питательных веществ, находящихся в почве: опавшие листья, различные органические вещества, в том числе соединения,



выделяемые корнями растений и т.д.; что касается эндофитных актинобактерий, то их экосистема ограничена лишь тканями растений.

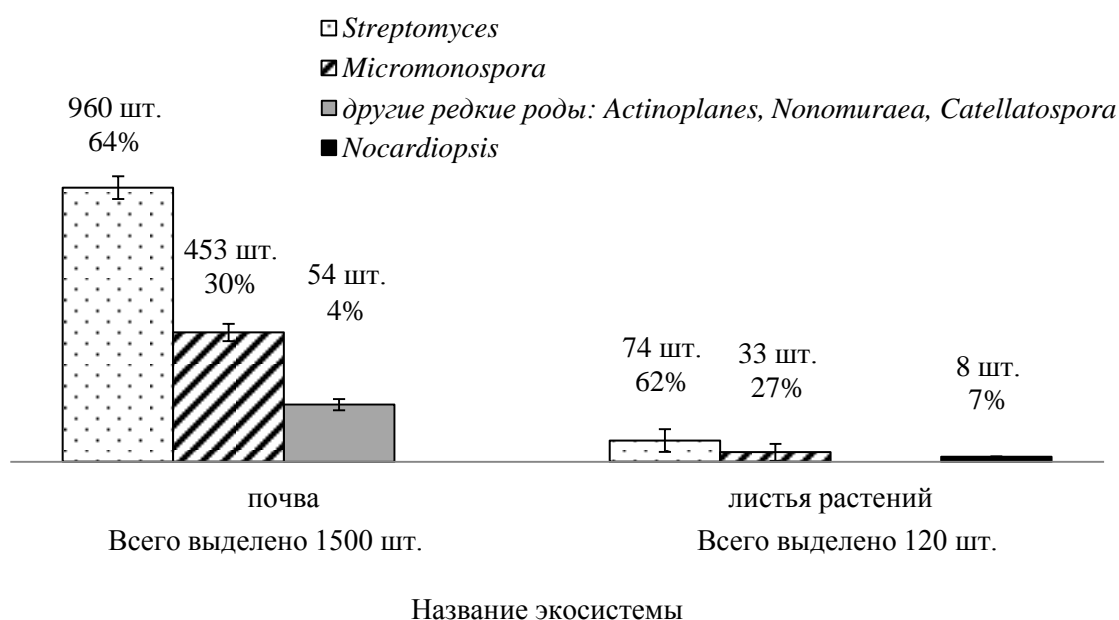
Таблица 15. Таксономическое разнообразие актинобактерий, выделенных из разных экосистем.

Роды	Количество выделенных штаммов (% от общего числа выделенных из экосистемы культур)	
	почва	листья лекарственных растений
<i>Streptomyces</i>	960 (64)	74 (61,6)
<i>Micromonospora</i>	453 (30,2)	33 (27,5)
<i>Catellatospora</i>	20 (1,3)	–
<i>Actinoplanes</i>	17 (1,13)	–
<i>Nonomuraea</i>	17 (1,13)	–
<i>Nocardiosis</i>	–	8 (6,7)
неидентифицированные штаммы	33 (2,2)	5 (4,2)
Общее количество выделенных штаммов	1500 (100)	120 (100)

*Примечание:* В процессе работы некоторые штаммы теряли свою жизнеспособность после нескольких пересевов, вследствие чего их таксономическое положение не определено. Их выделили в группу «неидентифицированные штаммы»; «←» – культуры указанного рода не были выделены.

Сравнивая таксономическое разнообразие актинобактерий 2-х экосистем – почвы и растений, можно заключить, что доминирующими в обеих экосистемах были культуры *Streptomyces* spp. Это согласуется с многочисленными литературными данными о том, что самыми часто выделяемыми актинобактериями как из почвы, так и из растений, являются культуры рода *Streptomyces* [Strobel et al., 2003; Coombs et al., 2003; Cao et al., 2004; Qin et al., 2011; Ноп et al., 2011; Adegboye et al., 2012; Huang et al., 2011; Koyama et al., 2012]. Среди культур актинобактерий, не принадлежащих роду *Streptomyces*, которые принято условно считать редкими родами, доминирующими в обеих экосистемах были культуры *Micromonospora* spp., что

также находит подтверждение в исследованиях других авторов [Coombs et al., 2003; Trujillo et al., 2006, 2007; Chen et al., 2007; Qin et al., 2009; Garcia et al., 2010]. Как видно из рисунка 15, в данной работе почвенные актинобактерии обладают большим родовым разнообразием редких родов – *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Micromonospora* и *Nonomuraea*, чем актинобактерии-эндофиты – культуры родов *Micromonospora* и *Nocardiosis*. Среди изученных источников литературы имеются только две работы, в которых были выделены культуры рода *Nocardiosis* [Chen et al., 2007; Qin et al., 2009]. По нашим данным из растений средней полосы России культуры этого рода были выделены впервые.



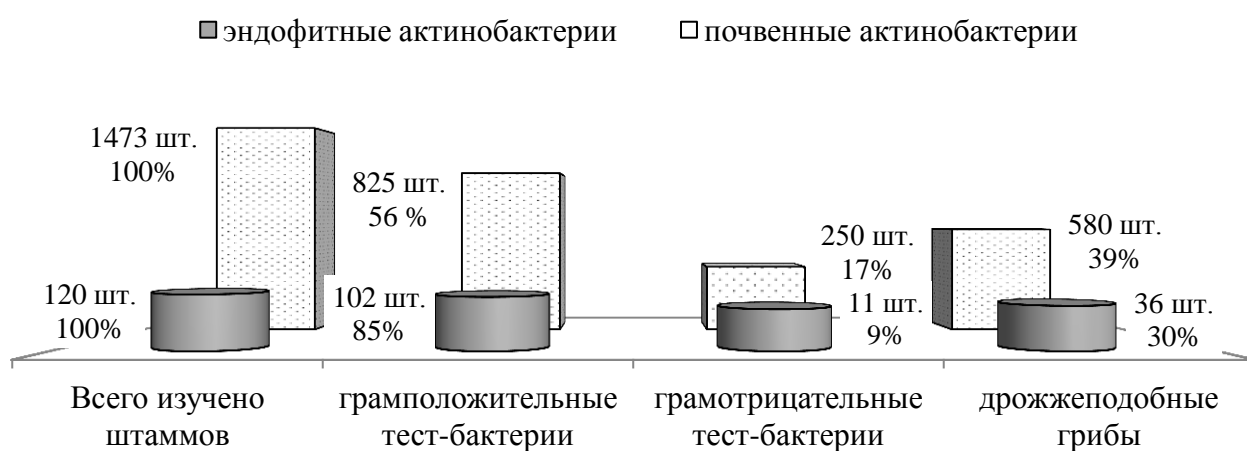
*Примечание:* достоверность различий соответствует  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 15. Сравнительные исследования биоразнообразия почвы и листьев растений.

Таким образом, сравнительный анализ таксономического разнообразия актинобактерий почвы и листьев растений показал, что наибольшим разнообразием обладает почва. Этого следовало ожидать, так как именно в почве представлено наибольшее таксономическое разнообразие не только актинобактерий, но и других типов микроорганизмов.

## 6.2. Сопоставление антибиотической активности актинобактерий почвы и растений.

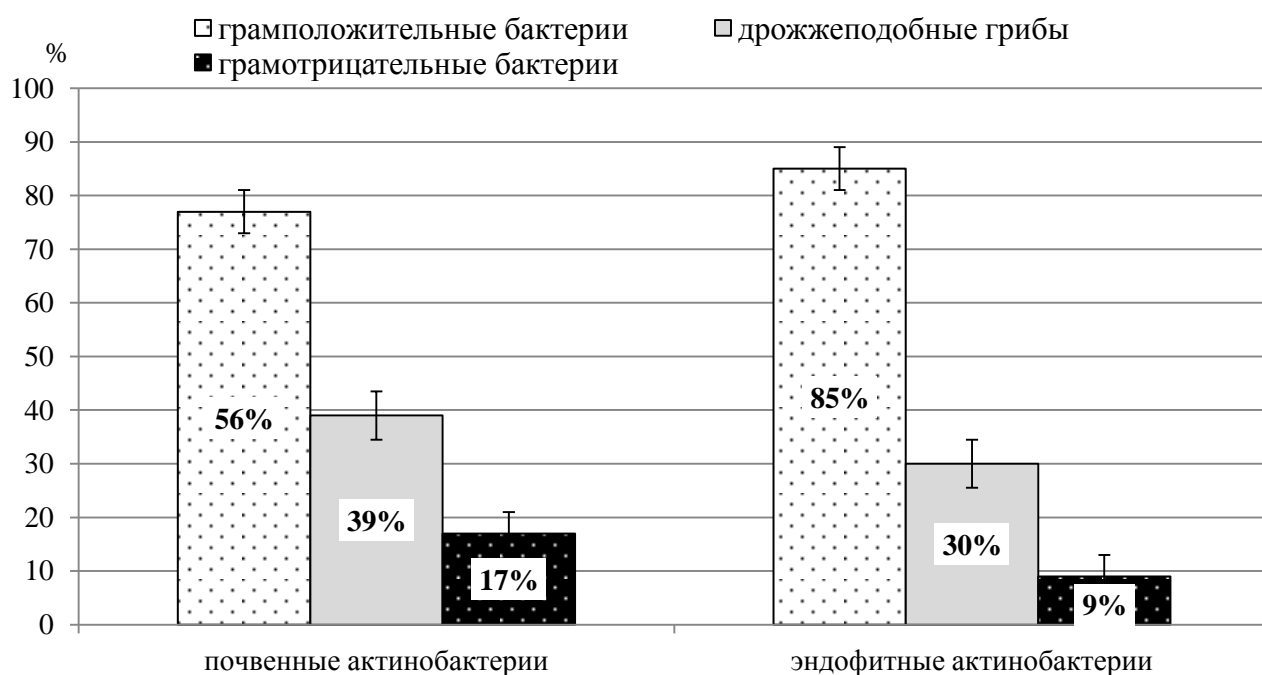
Антибиотическая активность была изучена у 1473 штаммов почвенных и 120 эндофитных актинобактерий актинобактерий, которые были выделены разработанными в представленной работе методами (рисунок 16). Большинство активных культур двух экосистем обладало узким спектром действия – 927 штаммов (58%) подавляли рост только грамположительных бактерий: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; из них 261 штамм (16%) был активен и в отношении грамотрицательных бактерий: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Активность в отношении дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae* ИНА S-1 была обнаружена у 616 культур (39%).



*Примечание:* грамположительные тест-бактерии – *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; грамотрицательные тест-бактерии – *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; дрожжеподобные грибы – *Saccharomyces cerevisiae* ИНА S-1.  
Достоверность различий соответствует  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 16. Количество актинобактерий-антагонистов, выделенных из почвы и листьев лекарственных растений.

Сравнительный анализ антибиотического спектра действия почвенных и эндофитных актинобактерий показывает, что среди почвенных актинобактерий больше культур обладало активностью в отношении дрожжеподобных грибов (на 9%) и в отношении грамотрицательных тест-бактерий (на 8%) по сравнению с эндофитными актинобактериями. Среди эндофитных актинобактерий было на 29% больше культур активных в отношении грамположительных тест-бактерий по сравнению с почвенными (рисунок 17).



*Примечание:* достоверность различий соответствует  $p \leq 0,05$ .

Рисунок 17. Процентное соотношение антибиотически активных актинобактерий, выделенных из почвенных и растительных образцов.

Можно заключить, что помимо почвенных актинобактерий, которые являются основными продуцентами применяемых в клинике антибиотиков, ценным источником потенциальных продуцентов новых антибиотических веществ являются эндофитные актинобактерии, продуцирующие биологически активные вещества с новыми биологическими спектрами действия и химическими структурами.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Антибиотики продолжают оставаться важнейшими препаратами для лечения инфекционных и онкологических заболеваний человека. Из-за возникновения резистентности патогенных микроорганизмов и раковых клеток к используемым в клинике химиотерапевтическим препаратам, требуется внедрение в медицинскую практику новых высокоактивных антибиотиков [Strobel et al., 2006]. Одним из актуальных направлений поиска продуцентов антибиотиков является изыскание продуцентов среди мало изученных и редких родов актинобактерий, к которым относят все роды порядка Actinomycetales, за исключением *Streptomyces*. Однако, успех поиска продуцентов новых антибиотиков в большой степени зависит от применения нестандартных методов для выделения актинобактерий из микробиоценозов. Кроме того выделить культуры продуцентов неизвестных ранее антибиотиков позволяет изоляция микроорганизмов-продуцентов из образцов нетрадиционных экосистем – гейзеров, сталактитов, кораллов, ледников, пустынь, растений и т.д. [Macagnan et al., 2006; Babalola et al., 2009; Khanna et al., 2011; Adegboye et al., 2012].

В связи с вышеизложенным важной задачей является разработка новых, нестандартных методов выделения культур актинобактерий и исследование новых и малоизученных экологических систем с целью изыскания продуцентов антибиотиков. В данной работе были разработаны селективные методы выделения актинобактерий из двух экосистем – почвы и растений, с использованием адреналина, гетероауксина (калиевая соль индолил-3-уксусной кислоты) и циркона (смесь гидроксикоричных кислот) в качестве селективных агентов. Применение разработанных методов способствовало прорастанию большего количества спор актинобактерий, увеличению общего количества выделяемых из экосистем культур актинобактерий, в том числе культур редких родов (не относящихся к *Streptomyces* spp.). Кроме того использование селективных агентов – адреналина, гетероауксина и циркона увеличивало число выделенных актинобактерий-продуцентов, а добавление адреналина и

гетероауксина в жидкие питательные среды способствовало индукции антибиотикообразования в глубинной культуре у культур редких родов актинобактерий.

Предпосылкой к разработке методов выделения актинобактерий из почвы с применением указанных соединений послужили данные литературы о стимуляции роста культур и стабилизации популяционного состава немитотических бактерий и актинобактерий биогенными аминами (биомедиаторами) – серотонином, норадреналином, адреналином и дофамином [Кагарлицкий и др., 2003; Филиппова и др., 2010]. Представленные исследования дали основания полагать, что биомедиаторы будут способствовать эффективному выделению культур актинобактерий из почвы за счет стимуляции прорастания большего количества спор, находящихся в почве. Работы по применению биогенных аминов для выделения актинобактерий из почв отсутствуют, поэтому нами был разработан метод селективного выделения актинобактерий из почвы с целью изоляции продуцентов антибиотиков и изучения влияния этих соединений на прорастание спор почвенных актинобактерий.

Результаты проделанной работы показали, что добавление в питательную среду адреналина и гетероауксина способствует увеличению количества выделяющихся из почвы колоний актинобактерий по сравнению с контролем: с добавлением адреналина – в 1,6 раз, а с добавлением гетероауксина – в 1,5 раза. По нашему мнению, увеличение количества выделяемых колоний, вероятнее всего, обусловлено инициацией прорастания большего количества спор за счет сигнального воздействия биомедиаторов на рецепторы клетки, регулирующие активность ферментов [Рощина, 2010; Филиппова и др., 2010].

Для разработки селективного метода с использованием адреналина и гетероауксина для выделения актинобактерий из микробиоценозов было отобрано 10 образцов почв Раменского и Озерского районов Московской области. В чистую культуру из почвенных образцов было выделено 1500 штаммов актинобактерий, у которых было определено таксономическое

положение. Результаты изучения фенотипических и геносистематических признаков выделенных из почвы культур показали, что доминирующими были культуры рода *Streptomyces*, что согласуется с многочисленными данными литературы [Strobel et al., 2003; Coombs et al., 2003; Cao et al., 2004; Alam et al., 2010; Adegboye et al., 2012; Huang et al., 2012; Koyama et al., 2012].

На селективных средах с биомедиаторами были выделены культуры редких родов *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Nonomuraea* и *Catellatospora*, в то время как в контроле удалось выделить культуры только одного рода *Micromonospora*, условно считающегося редким, так как относительно культур рода *Streptomyces* он выделяется значительно реже. Добавление адреналина в селективные среды в концентрации 1 мкг/мл увеличивало общее число представителей редких родов актинобактерий в 3,8 раза, а гетероауксина в концентрации 20 мкг/мл – в 2,75 раза по сравнению с высевом почвенных образцов на среду без селективных агентов. Благодаря наличию в составе питательных сред биогенных аминов были выделены культуры *Actinoplanes* spp., *Nonomuraea* spp. и *Catellatospora* spp.

Таким образом, добавление в селективные среды растворов адреналина и гетероауксина позволило не только увеличить общее количество выделенных культур порядка Actinomycetales, но и способствовало выделению культур редких таксонов (не относящихся к роду *Streptomyces*), которые считаются перспективными продуцентами еще неизученных антибиотиков.

В последние годы большое внимание уделяется изучению эндофитных актинобактерий, привлекающих внимание в качестве потенциальных продуцентов новых биологически активных веществ [Strobel et al., 2006; Qin et al., 2011; Ambrose et al., 2013; Abdalla et al., 2014; Akshatha et al., 2014; Gangwar et al., 2014; Golinska et al., 2015]. Эндофитными актинобактериями называются мицелиальные бактерии, которые населяют внутренние ткани высших растений и находятся с ними в симбиотических или мутуалистических отношениях [Strobel et al., 2003]. Известно, что эндофитные актинобактерии являются продуцентами различных природных соединений в тканях растения-хозяина:

энзимов, индолил-уксусной кислоты, сидерофоров и антибиотиков [Gangwar et al., 2012]. Влияние эндофитных актинобактерий на растение-хозяина многогранно и включает в себя повышение стрессоустойчивости, гербицидоустойчивости и усиление сопротивляемости к различным растительным патогенам [Shimizu et al., 2000; Lehr, 2008; Conn et al., 2008]. Однако, в имеющейся научно-методической литературе, посвященной вопросам изучения эндофитных актинобактерий, работы по направленному выделению актинобактерий из растений Российской Федерации отсутствуют. Методы, которые применялись для выделения микроорганизмов, описанные в работах по изучению эндофитных немитохондриальных бактерий [Мубинов, 2007], грибов злаковых [Благовещенская, 2006; Шеленга, 2006], дрожжей [Исаева, 2012] и азотфиксирующих культур [Малашин, 2009] не способствовали выделению актинобактерий. Несмотря на обилие работ по различным аспектам изучения эндофитных микроорганизмов, направленное выделение и изучение актинобактерий-эндофитов из растений Российской Федерации было проведено нами впервые, как среди отечественных, так и зарубежных работ.

В зарубежной научно-методической литературе приведено множество методов по селективному выделению эндофитных актинобактерий из разных частей растений: корней, стеблей и листьев [Araújo et al., 2000; Otoguro et al., 2001; Cao et al., 2004; Omarjee et al., 2004; Qin et al., 2009]. Изученные методы не оказались эффективными при выделении эндофитных актинобактерий из образцов растений средней полосы России, поэтому нами был разработан новый метод, позволяющий исследовать эндофитные актинобактерии на примере растений, собранных на территории Москвы и Московской области. Для этого нами были подобраны составы стерилизующих агентов, их оптимальные концентрации и время действия на растительные ткани: 75% этиловый спирт – 5 минут, 1% раствор гипохлорита натрия – 20 минут. Новизна разработанного селективного метода состоит в том, что впервые были использованы растворы циркона (1 мкг/мл) и гетероауксина (20 мкг/мл) для предобработки поверхностно стерилизованных листьев с целью стимуляции



прорастания спор эндофитных актинобактерий на чашках Петри. Для того, чтобы образцы растений не высыхали на чашках в процессе выделения актинобактерий, нами впервые были приготовлены водные суспензии из растительных тканей, которые впоследствии высевались на чашки Петри.

Благодаря предобработке растений селективными агентами эндофитные актинобактерии удалось выделить из всех 20-ти исследованных образцов растений, в то время как в контроле актинобактерии-эндофиты были выделены только из 14 образцов. Следует также отметить, что колонии, выросшие после обработки листьев гетероауксином, характеризовались лучшим ростом, что способствовало выделению в чистую культуру большего количества колоний, выросших на чашках. Так, по сравнению с контрольными чашками после предобработки гетероауксином выделилось в 3,1 раза больше колоний эндофитных актинобактерий, а после предобработки цирконом – в 2,5 раза. По всей видимости, являясь стимуляторами деления клеток в растениях, гетероауксин и циркон способны связываться со специфическими мембранными рецепторами и оказывать индуцирующее воздействие на клеточный метаболизм эндофитных микроорганизмов, за счет чего происходит прорастание большего количества спор микроорганизмов-эндофитов [Кагарлицкий и др., 2003].

Таким образом, разработанный метод выделения эндофитных актинобактерий из лекарственных растений способствует выделению эндофитных актинобактерий из тканей растений средней полосы России. Предобработка растительных тканей гетероауксином и цирконом способствует прорастанию большего количества спор актинобактерий-эндофитов, что увеличивает вероятность обнаружения продуцентов антибиотических веществ с ценными биологическими и химическими свойствами.

Определение таксономического положения всех выделенных из листьев лекарственных растений актинобактерий показало, что преобладающими были культуры *Streptomyces* spp., что согласуется с данными литературы [Bérdu, 2005; Qin et al., 2009; Qin et al., 2011; Ambrose et al., 2011; Huang et al., 2012;

Gangwar et al., 2014; Golinska et al., 2015]. Так, предобработка растительных тканей гетероауксином способствует увеличению количества выделяемых культур *Streptomyces* spp. в 4,5 раза, предобработка цирконом – в 2,7 раза по сравнению с контролем. Кроме того, предобработка листьев селективными агентами стимулировала выделение культур, не принадлежащих роду *Streptomyces*: предобработка гетероауксином увеличивала количество культур *Micromonospora* spp. в 5 раз по сравнению с контролем и способствовала выделению культур *Nocardiopsis* spp. Стоит отметить, что эндофитные культуры *Nocardiopsis* spp. выделяются очень редко, известно только о двух работах, в которых были выделены культуры этого рода [Chen et al., 2007; Qin et al., 2009]. Обработка цирконом увеличивала количество культур *Micromonospora* spp. в 2,25 раза по сравнению с контролем, однако представителей других культур редких родов выделено не было.

Таким образом, из листьев лекарственных растений средней полосы России разработанным в данной работе методом были выделены эндофитные актинобактерии *Streptomyces* spp., *Micromonospora* spp. и *Nocardiopsis* spp. Похожие результаты по количеству выделенных родов эндофитных актинобактерий были у Coombs'а и Franco (2003): выделенные из корней *Triticum aestivum* эндофитные актинобактерии принадлежали всего к 4 родам – *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora* и *Nocardioides* [Coombs et al., 2003], несмотря на то, что в корнях растений содержится наибольшее количество и разнообразие видов эндофитных микроорганизмов [Zinniel et al., 2002]. Выделяя актинобактерии из листьев и корней *Musa acuminata* – растения тропического региона, Cao и соавторы [Cao et al., 2004] выделили культуры принадлежащие только 3 родам – *Streptomyces*, *Streptovercillium* и *Nocardia*, однако, согласно данным литературы в растениях тропического региона находится наибольшее разнообразие видов актинобактерий [Strobel et al., 2003; Thamchaipenet et al., 2009].

Одной из поставленных задач нашего исследования было изучение антагонистических свойств выделенных культур и отбор штаммов,

перспективных для изыскания новых биологически активных веществ. Антибиотические свойства были изучены у 1473 штаммов почвенных актинобактерий и 120 штаммов эндофитных актинобактерий в отношении грамположительных, грамотрицательных тест-бактерий и дрожжеподобных грибов. Большинство активных культур двух экосистем подавляли рост грамположительных бактерий – 927 штаммов (58%); из них 261 штамм (16%) был активен и в отношении грамотрицательных тест-бактерий. Активными в отношении дрожжеподобных грибов были 616 культур (39%).

В процессе изучения антибиотических свойств выделенных культур было отмечено, что применение селективных агентов способствует выделению большего количества актинобактерий, обладающих антибиотической активностью в отношении всех изученных тест-бактерий. Выделение актинобактерий из почвы на селективных средах с добавлением адреналина (1 мкг/мл) и гетероауксина (20 мкг/мл) увеличивало количество выделяемых актинобактерий, активных в отношении грамположительных тест-бактерий, включая метициллинорезистентного стафилококка (MRSA), на 29% и 26% соответственно, а в отношении грамотрицательных тест-бактерий на 9%; в отношении дрожжеподобных грибов на 27% и 23% соответственно. Предобработка листьев гетероауксином (20 мкг/мл) и цирконом (1 мкг/мл) способствовала выделению антибиотически активных штаммов в отношении грамотрицательных тест-бактерий, а также увеличению количества актинобактерий-эндофитов активных в отношении грамположительных тест-бактерий на 19% (гетероауксин) и 17% (циркон) по сравнению с контролем. Кроме того, обработка растительных тканей гетероауксином и цирконом способствовала выделению актинобактерий, активных в отношении грамотрицательных бактерий, в контроле их выделено не было.

По результатам определения таксономического положения и изучения антибиотического спектра действия из 1593 культур актинобактерий, как почвенных (1473 штаммов), так и эндофитных (120 штаммов), было отобрано 36 штаммов, перспективных для дальнейшего изыскания продуцентов

антибиотиков. Данные культур принадлежали *Streptomyces* spp., *Nonomuraea* spp., *Actinoplanes* spp. и *Nocardiosis* spp. Культуры были переданы для дальнейшей работы в другие подразделения института.

Помимо изучения антибиотического спектра выделенных из почвы и листьев лекарственных растений культур, в данной работе было проведено исследование условий индукции образования антибиотиков штаммами редких родов актинобактерий при глубинном культивировании. По результатам таксономического изучения выделенных культур и антибиотическому спектру действия в отношении тест-бактерий было отобрано 6 штаммов почвенных актинобактерий и 9 штаммов эндофитных актинобактерий редких родов. Для исследований антибиотикообразования отобранные культуры выращивали на 10-ти жидких питательных средах различного состава. Антибиотическую активность проверяли методом диффузии на органическом агаре 2 Гаузе в отношении набора тест-бактерий. В контрольных образцах отобранные культуры активности не проявляли.

Из источников литературы известно, что биосинтез антибиотиков инициируется посредством ауторегуляторов или мутагенеза [Малкина, 1998; Черногор, Винников, 2004]. Также известно, что биогенные амины влияют на биохимические и метаболические процессы в клетках [Рощина, 2010]. Предположив, что растворы биогенных аминов могут оказать индуцирующее действие на биосинтез антибиотиков, так как они влияют на активизацию биохимических и метаболических процессов в клетках, была проведена серия экспериментов по подбору действующих концентраций; проверке чувствительности тест-бактерий к адреналину и гетероауксину и опыты по индукции биосинтеза антибиотиков путем добавления в жидкие питательные среды биогенных аминов. Оптимальной концентрацией действия адреналина была 1 мкг/мл, гетероауксина – 20 мкг/мл.

В результате проведенных экспериментов установлено, что при ферментации культур на жидких питательных средах – среде 2663, органической среде 2 Гаузе с мелом и среде 11654 с адреналином (1 мкг/мл)

и/или гетероауксином (20 мкг/мл) у 8 штаммов из 15-ти появилась антибиотическая активность в отношении грамположительных тест-бактерий *Staphylococcus aureus* ИНА 00762 и *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Вероятнее всего, адреналин и гетероауксин, являясь биологически активными соединениями, могут стимулировать активацию ферментов синтеза вторичных метаболитов посредством активизации биохимических и метаболических процессов в клетках [Рощина, 2010; Herbert et al., 1964].

Итак, путем добавления биогенных аминов в состав жидких питательных сред было индуцировано антибиотикообразование у большинства изученных культур, что имеет очень важное практическое значение, так как многие культуры, выделенные из экосистем, не проявляют антибиотической активности на стандартных жидких питательных средах *in vitro*, следовательно, не изучаются образующиеся ими антибиотические вещества, которые могут обладать новыми биохимическими свойствами.

В представленной работе выделение актинобактерий проводилось из 2-х экологических систем – почвы и растений. Представляло интерес сравнить полученные результаты биоразнообразия и антибиотического спектра действия почвенных и эндофитных актинобактерий. Сопоставление таксономического разнообразия выделенных из почв и растений актинобактерий показало, что наибольшим биоразнообразием обладает почва. Этого следовало ожидать, так как именно в почве представлено наибольшее таксономическое разнообразие не только актинобактерий, но и других видов микроорганизмов [Ленгелер и др., 2005]. Доминирующими культурами в обеих экосистемах были *Streptomyces* spp. Это согласуется с данными литературы – род *Streptomyces* является самым распространенным родом порядка Actinomycetales. Среди культур редких родов, к которым относят все роды, кроме *Streptomyces*, самыми распространенными были культуры *Micromonospora* spp. Из источников литературы известно, что род *Micromonospora* является наиболее распространенным и изученным среди редких родов актинобактерий [Гаузе, 1961; Bérdy, 2005]. Помимо штаммов *Micromonospora* spp. из почвенных

образцов были выделены штаммы *Actinoplanes* spp., *Catellatospora* spp. и *Nonomuraea* spp., среди эндофитных штаммов актинобактерий были выделены штаммы *Nocardiosis* spp.

Сопоставление антагонистических свойств актинобактерий почв и растений показало, что по сравнению с эндофитными актинобактериями среди почвенных актинобактерий больше культур обладает активностью в отношении дрожжеподобных грибов (на 9%) и грамотрицательных тест-бактерий (на 8%). Среди эндофитных актинобактерий, по сравнению с почвенными, на 29% больше культур, проявляющих антибиотическую активность в отношении грамположительных тест-бактерий.

Можно заключить, что помимо почвы, которая является основным источником продуцентов антибиотиков, ценным источником потенциальных продуцентов новых веществ являются растения, внутренние ткани которых колонизируют эндофитные актинобактерии, продуцирующие биологически активные вещества различного спектра антибиотического действия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе изыскания новых антибиотиков самым первым и важным является этап выделения и обнаружения продуцентов биологически активных веществ. Ввиду этого, актуальным является вопрос разработки новых методов выделения актинобактерий из экосистем, которые позволили бы выделять большее количество актинобактерий из природных местообитаний. Для этой цели в представленной работе были разработаны методы изоляции актинобактерий, с использованием растворов биологически активных веществ – адреналина, гетероауксина и циркона, которые способствовали прорастанию большего количества спор актинобактерий на чашках Петри. Разработанные методы также способствовали выделению большего количества таксонов актинобактерий (по сравнению с контролем) – *Streptomyces* spp., *Micromonospora* spp., *Actinoplanes* spp., *Nonomuraea* spp., *Nocardioopsis* spp. и *Catellatospora* spp., которые представляют собой привлекательный источник продуцентов новых антибиотиков для медицинского применения. Кроме того, разработанные методы выделения актинобактерий, способствовали выделению антибиотически активных культур в отношении грамположительных тест-бактерий, в том числе метициллинорезистентного стафилококка (MRSA), грамотрицательных тест-бактерий и дрожжеподобных грибов.

При изучении условий индукции биосинтеза антибиотиков штаммами актинобактерий редких родов, было обнаружено иницирующее действие адреналина и гетероауксина, входящих в состав жидкой питательной среды, на образование антибиотиков у культур редких родов актинобактерий.

В результате проведенных исследований была создана коллекция почвенных и эндофитных актинобактерий, содержащая редко выделяющиеся штаммы актинобактерий, которые могут служить объектами как научных изысканий, так и для скрининга продуцентов неизвестных антибиотиков.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан новый метод изоляции актинобактерий из почвы с применением адреналина и/или гетероауксина, способствующий селективному выделению культур *Micromonospora* spp., *Actinoplanes* spp. и *Nonomuraea* spp., а также редко выделяющихся культур *Catellatospora* spp.
2. Разработан новый метод селективного выделения эндофитных актинобактерий с применением гетероауксина и циркона, способствующий выделению большего количества культур актинобактерий-эндофитов, в том числе штаммов *Micromonospora* spp. и редко изолируемых культур эндофитов *Nocardiopsis* spp. Направленное изучение эндофитных актинобактерий, населяющих внутренние ткани растений средней полосы России, было проведено впервые.
3. Установлено, что адреналин, гетероауксин и циркон являются стимуляторами прорастания спор актинобактерий: применение данных соединений приводит к увеличению количества выделяемых культур актинобактерий.
4. Создана коллекция почвенных и эндофитных актинобактерий, включающая редко выделяющиеся штаммы *Catellatospora* spp. и *Nocardiopsis* spp., которая может служить ресурсным потенциалом микроорганизмов, как для научных исследований, так и для изыскания продуцентов антибиотиков для медицинского и биотехнологического применения. Таксономическое положение выделенных культур актинобактерий было установлено традиционными и молекулярно-генетическими методами.
5. Показано, что выделение актинобактерий из почвы на селективные среды с добавлением адреналина и гетероауксина увеличивало количество выделяемых актинобактерий, активных в отношении грамположительных тест-бактерий, включая метициллинорезистентного стафилококка (MRSA), на 29% и 26% соответственно. Показано, что предобработка растительных тканей гетероауксином и цирконом увеличивала количество выделяемых



антибиотически активных штаммов эндофитных актинобактерий на 19% и 17% соответственно, а также способствовала выделению актинобактерий, активных в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*.

6. Показано, что добавление адреналина и/или гетероауксина в жидкие питательные среды инициирует антибиотикообразование в отношении грамположительных тест-бактерий *Staphylococcus aureus* и *Micrococcus luteus* у 8-ми штаммов редких родов актинобактерий из 15-ти изученных.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Алферова И.В., Терехова Л.П. Применение метода обогащения почвы карбонатом кальция с целью выделения актиномицетов // Антибиотики и химиотерапия, 1988, 33 (12): 888-890.
2. Алферова И.В., Терехова Л.П., Праузер Х. Селективная среда с налидиксовой кислотой для выделения актиномицетов – продуцентов антибиотиков // Антибиотики и химиотерапия, 1989, 34 (5): 344-347.
3. Алферова И.В. Разработка методов селективного выделения из почв актиномицетов редких родов – потенциальных продуцентов антибиотиков: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (14.00.31) / Алферова Ирина Вадимовна; Институт по изысканию новых антибиотиков РАМН. – Москва, 1992. –176 с.
4. Бабич Т.Л. Экологическая характеристика почвенных актиномицетов на основе сукцессионного анализа: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.00.07) / Бабич Тамара Леонидовна; ф-т почвовед. МГУ им. М.В. Ломоносова. – Москва, 1997. –153 с.
5. Благовещенская Е.Ю. Эндوفитные грибы злаков: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.00.24) / Благовещенская Екатерина Юрьевна; биол. ф-т МГУ им. М.В. Ломоносова. – Москва, 2006. –138 с.
6. Булина Т.И. Разработка новых методов выделения актиномицетов из природных источников с использованием физических факторов: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (14.00.31) / Булина Татьяна Ивановна; НИИ по изыск. новых антибиот. РАМН. – Москва, 1998 – 158 с.
7. Галактионов С.Г. Биологически активные [Электронный ресурс] // Издательство «Молодая гвардия», серия «Эврика». – 1988. – Режим доступа: <http://n-t.ru/ri/ga/ba/htm>

8. Галатенко О.А., Терехова Л.П., Преображенская Т.П. Применение метода облучения почвенных образцов ультрафиолетом для выделения актиномицетов редких родов // Алма-Ата «Гылым». – 1990. – с. 29-35
9. Гаузе Г.Ф. Пути изыскания новых антибиотиков. Изд-во Академии наук СССР, Москва, 1961. 174 с.
10. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.Л., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов // М.: Наука, 1983. 245 с.
11. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках // М.: Наука, 2005. – 528 с.
12. Ефременкова О.В. Ауторегуляторы группы А-фактора // Биоорганическая химия, 2016, №5, С. 508-525.
13. Зенова Г.М. Актиномицеты в наземных экосистемах: дис. на соиск. учен. степ. д-ра биол. наук (03.00.27, 03.00.07) / Зенова Галина Михайловна; ф-т почвовед. МГУ им. М.В.Ломоносова. – Москва, 1998. – 346 с.
14. Иванова Е.А. Модельные ассоциации цианобактерий *Anabaena variabilis* и актиномицетов и их роль в изменении структуры глинистых минералов: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.02.03, 03.02.12) / Иванова Екатерина Андреевна; ф-т почвовед. МГУ им.М.В.Ломоносова. – Москва, 2013. –111 с.
15. Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А., Ступарь О.С. Специфика микробных комплексов зоны и клубеньков актиноризных растений // Микробиология, 1994, Т.63, С.909-916.
16. Исаева О.В. Экология эндофитных дрожжей: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.02.03) / Исаева Ольга Валерьевна; ф-т почвовед. МГУ им.М.В.Ломоносова. – Москва, 2012. – 110 с.
17. Кагарлицкий Г.О., Кировская Т.А., Олескин А.В. Действие нейромедиаторных аминов на рост и дыхание микроорганизмов [Электронный ресурс] / Г.О. Кагарлицкий // М.: Биологический факультет

МГУ. – 2003. – Режим доступа:

<http://www.sevin.ru/fundecology/biopolitics/biopol2.html>

18. Курапова А.И. Термотолерантные актиномицеты в пустынных, вулканических и горной почвах: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.02.03.) / Курапова Анна Игоревна; ф-т почвовед. МГУ им.М.В.Ломоносова. – Москва, 2011. –149 с.
19. Ленгелер Й., Древис Г., Шлегель Г. Современная микробиология: Прокариоты: В 2-х томах: Т. 2. – М.: Мир, 2005. – 496 с.: ил., 24 с. цв. ил.
20. Ли Ю.В. Выделение актиномицетов из почвы с использованием КВЧ-излучения: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.00.07) / Ли Юлия Валентиновна; НИИ по изыск. новых антибиот. им. Г.Ф. Гаузе РАМН. – Москва, 2003 – 152 с.
21. Лысак Л.В. Бактериальные сообщества городских почв: дис. на соиск. учен. степ. д-ра биол. наук (03.02.03) / Лысак Людмила Вячеславовна; ф-т почвовед. МГУ им.М.В.Ломоносова. – Москва, 2010. – 304 с.
22. Малашин С.Н. Влияние ассоциативных азотфиксирующих микроорганизмов на продуктивность овсяницы красной на Северо-Западе РФ: дис. на соиск. учен. степ. канд. сельхоз. наук (06.01.04) / Малашин Сергей Николаевич; ГНУ Ленинградский Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии. – Санкт-Петербург – Пушкин, 2009. –101 с.
23. Малкина Н.Д. Индукция образования антибиотиков неактивными культурами актиномицетов: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (14.00.31) / Малкина, Наталья Дмитриевна; Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков РАМН. – Москва, 1998. – 155 с.

24. Манучарова Н.А. Молекулярно-биологические аспекты исследований в экологии и микробиологии: Учебное пособие – М. Издательство МГУ, 2010 – 47 с.
25. Михайлова Н.В. Выявление олигоспоровых актиномицетов с применением предобработки хлорамином Б // Проблемы экол. и физиол. микроорганизмов: К 110-летию со дня рожд. проф. Е.Е.Успенского. Научн. конф., 21. дек., 1999. Москва, МГУ. М. 2000. С.79.
26. Мубинов И.Г. Реакции пшеницы на действие клеток эндофитного штамма 26Д *Bacillus subtilis* – основы биофунгицида фитоспорин: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.00.12) / Мубинов Искандар Гарифвич; ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет». – Уфа, 2007. – 130 с.
27. Оборотов Г.В. Актиномицеты засоленных почв: дис. на соиск. учен. степ. д-ра биол. наук (03.00.07) / Оборотов Геннадий Вячеславович; ф-т почвовед. МГУ им. М.В.Ломоносова. – Москва, 2007. – 101 с.
28. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т.2: Пер. с англ. / под ред. Дж. Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж. Стейли, С.Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 368 с.
29. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М.: Издательство РАМН, 2000. С. 11-16
30. Рощина В.В. Нейротрансмиттеры – биомедиаторы и регуляторы растений: Учебное пособие. [Электронный ресурс] / В.В. Рощина // Пушино: Институт биофизики клетки РАН. – 2010. – Режим доступа: <http://window.edu.ru/resource/504/68504/files/neurotransmitters.pdf>

31. Терехова Л.П. Преображенская Т.П., Галатенко О.А. Поиск новых антибактериальных антибиотиков из редких родов актиномицетов // Антибиотики и химиотерапия, 1989, 34(5): 390-394.
32. Терехова Л.П., Галатенко О.А., Алферова И.В. Использование селективных сред для выделения актиномицетов // Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. Алма-Ата: Гылым, 1990. С.5-12
33. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Принципы селекции растений на взаимодействие с симбиотическими микроорганизмами // Вестник ВОГиС, 2005, 9(3): 295-305.
34. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Касаикина О.Т., Круговов Д.А., Гальченко В.Ф. Индукция роста и стабилизация популяционного состава *Saccharopolyspora erythraea* соединениями из группы катехоламинов // Микробиология, 2010, 79(2): 213-218.
35. Хохлов А. С. Регуляторы развития микроорганизмов. – М.: Наука, 1979. – С. 139-157.
36. Хохлов А. С. Низкомолекулярные микробные ауторегуляторы. – М.: Наука, 1988. –272 с.
37. Черногор Н. П, Винников А. И., 2004. Ауторегуляторы роста микроорганизмов [Электронный ресурс] // Днепропетровский национальный университет. – 2004. – Режим доступа: <http://www.stattionline.org.ua/biolog/47/5832-autoregulatory-rosta-mikroorganizmov.html>
38. Шеленга Т.В. Характеристика эндофитсодержащих образцов овсяницы луговой (*Festuca pratensis huds.*) из коллекции ВИР им. Н.И.Вавилова: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.00.12, 03.00.32) / Шеленга Татьяна Васильевна; Российская академия сельскохозяйственных наук

государственный научный центр Российской Федерации всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И.Вавилова. – Санкт-Петербург, 2006. – 103 с.

39. Abdalla M.A., Matasyoh J.C. Endophytes as producers of peptides: an overview about the recently discovered peptides from endophytic microbes // Nat. Prod. Bioprospect., 2014, 4(5): 257-270.
40. Adegboye M.F., Babalola O.O. Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes // Afr. J. Agric. Res., 2012, 7(15): 2255-2261.
41. Ahmed M., Hussain M., Dhar M. K., Kaul S. Isolation of microbial endophytes from some ethnomedicinal plants of Jammu and Kashmir // J. Nat. Prod. Plant Resour., 2012, 2(2): 215-220.
42. Akshatha V.J., Nalini M.S., D'Souza C., Prakash H.S. *Streptomyces* endophytes from anti-diabetic medicinal plants of the Western Ghats inhibit alpha-amylase and promote glucose uptake // Lett. Appl. Microbiol., 2014, 58:433–439.
43. Alam M.T., Merlo M.E., Takano E., Breiting R. Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives // Mol. Phylogen. Evol., 2010, 54: 763-772.
44. Ambrose C., Varghese C., Subhash J. B. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview // Pharmacogn Rev., 2013, 7(13): 11–16.
45. Araújo J. M., Silva A. C., Azevedo J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) // Braz. arch. biol. technol., 2000, 43(4): 447-451.
46. Araújo W. L., Marcon J., Maccheroni W., Elsas J. D., Vuurde J. W. L., Azevedo J. L. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants // Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68: 4906-4914.

47. Babalola O. O., Kirby B.M., Le Roes-Hill M., Cook A. E., Cary S. C., Burton S. G., Cowan D. A. Phylogenetic analysis of actinobacterial populations associated with Antarctic Dry Valley mineral soils // *Environ. Microbiol.*, 2009, 11(3): 566-576.
48. Bacon C.W. Procedure for Isolating the Endophyte from Tall Fescue and Screening Isolates for Ergot Alkaloids // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54(11): 2615–2618.
49. Baltz R.H. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes // *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2008, 8(5):557-563.
50. Bascom-Slack C.A., Ma C., Moore E., Babbs B., Fenn K., Greene J.S., Hann B.D., Keehner J., Kelley-Swift E.G., Kembaiyan V., Lee S.J., Li P., Light D.Y., Lin E.H., Schorn M.A., Vekhter D., Boulanger L.A., Hess W.M., Vargas P.N., Strobel A., Strobel S.A. Multiple, novel biologically active endophytic actinomycetes isolated from upper Amazonian rainforests // *Microb. Ecol.*, 2009, 58(2): 374-383.
51. Bérdy J. Bioactive microbial metabolites // *J. Antibiot.*, 2005, 58(1):1-26.
52. Callahman D., Deltredici P., Torrey J.G. Isolation and Cultivation in vitro of the Actinomycete Causing Root Nodulation in *Comptonia* // *Science.*, 1978, 199(4331): 899-902.
53. Campbell N., Reece J., Mitchell L. *Biology. Fifth Edition* // Benjamin-Cummings Pub Co., USA, 1999, 756 p.
54. Cao L., Qiu Z., Dai X., Tan H., Lin Y., Zhou S. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* // *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 20: 501–504.



55. Cao L., Qiu Z., You J., Tan H., Zhou S. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots // *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, 247(2): 147-152.
56. Castillo U.F., Strobel A., Ford E.J., Hess W.M., Porter H., Jensen J.B., Albert H., Robison R., Condrón M.A., Teplow D.B., Stevens D., Yaver D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans* // *Microbiology.*, 2002, 148(9): 2675-2685.
57. Castillo U.F., Harper J.K., Strobel A., Sears J., Alesi K., Ford E., Lin J., Hunter M., Maranta M., Ge H., Yaver D., Jensen J.B., Porter H., Robison R., Millar D., Hess W.M., Condrón M., Teplow D. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia* // *FEMS Microbiol Lett.*, 2003, 224(2): 183-190.
58. Castillo U.F., Strobel A., Mullenberg K., Condrón M.M., Teplow D.B., Folgiano V., Gallo M., Ferracane R., Mannina L., Viel S., Codde M., Robison R., Porter H., Jensen J. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052 // *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006, 255(2): 296-300.
59. Chen H.H., Li ., Yang Y., Li W.J., Xu L.H., Jiang C.L. Study on diversity and phylogenetic analysis of endophytic actinobacteria from herbal medicine of Dai in Yunnan, China // 14<sup>th</sup> ISBA, 2007, p. 124.
60. Chen H.H., Qin S., Lee J.C., Kim C.J., Xu L.H., Li W.J. *Streptomyces mayteni* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a Chinese medicinal plant // *Antonie van Leeuwenhoek*, 2009a, 95: 47-53.
61. Chen H.H., Qin S., Li ., Zhang Y.Q., Xu L.H., Jiang C.L., Kim C.J., Li W.J. *Pseudonocardia endophytica* sp. nov., isolated from the pharmaceutical plant *Lobelia clavata* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009b, 59(3): 559-563.

62. Compant S., Clément C., Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization // *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(5): 669–678.
63. Conn V.M., Franco C.M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70(3): 1787-1794.
64. Conn V.M., Walker A.R., Franco C.M. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2008, 21(2): 208-218.
65. Coombs J.T., Franco C.M. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(9): 5603-5608.
66. Davis K.E., Joseph S.J., Janssen P.H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(2): 826-834.
67. Ding L., Münch J., Goerls H., Maier A., Fiebig H.H., Lin W.H., Hertweck C. Xiamycin, a pentacyclic indolosesquiterpene with selective anti-HIV activity from a bacterial mangrove endophyte // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, 20(22): 6685-6687.
68. Duangmal K., Thamchaipenet A., Matsumoto A., Takahashi Y. *Pseudonocardia acaciae* sp. nov., isolated from roots of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, 59(6):1487-1491.
69. Duntze W., Stotzler D., Bucking-Throm E. Purification and partial characterization of a-factor, a mating-type specific-inhibitor of cell

- reproduction from *Saccharomyces cerevisiae* // *Eusop. j. Biochem.* - 1973. - Vol. 35. - P. 357-365.
70. Elbeltagy A., Nishioka K., Sato T., Suzuki H., Ye B., Hamada T., Isawa T., Mitsui H., Minamisawa K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67(11): 5285-5293.
71. El-Gendy M.M., El-Bondkly A.M. Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamycin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya48 // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 37(8): 831-841.
72. Éthier J.F., Harpin S., Girard C., Beaulieu C., Déry C., Brzezinski R. Cloning of two xylanase genes from the newly isolated actinomycete *Actinomadura* sp. strain FC7 and characterization of the gene products // *Canadian J. Microbiol.*, 1994, 40(5): 362-368.
73. Ezra D., Castillo U.F., Strobel A., Hess W.M., Porter H., Jensen J.B., Condrón M.A., Teplow D.B., Sears J., Maranta M., Hunter M., Weber B., Yaver D. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. // *Microbiology.*, 2004, 150(4):785-793.
74. Gai C.S., Lacava P.T., Maccheroni W.J., Glienke C., Araújo W.L., Miller T.A., Azevedo J.L. Diversity of endophytic yeasts from sweet orange and their localization by scanning electron microscopy // *J. Basic. Microbiol.*, 2009, 49(5): 441-451.
75. Gaillard B.D. Use of unneutralized hydrolysates in paper chromatography of sugars // *Nature.* 1953, 171(4365): 1160.

76. Gangwar M., Rani S., Sharma N. Investigating endophytic actinomycetes diversity from rice for plant growth promoting and antifungal activity // *Inter. J. Advan. Life Science*, 2012, 1: 10-21.
77. Gangwar M., Dogra S., Phutela U. P., Kharwar R.N. Diversity and biopotential of endophytic actinomycetes from three medicinal plants in India // *Afr. J. Microbiol. Research*, 2014, 8(2): 184-191.
78. Garcia L.C., Martínez-Molina E., Trujillo M.E. *Micromonospora pisi* sp. nov., isolated from root nodules of *Pisum sativum* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, 60(2):331-337.
79. Golinska P., Wypij M., Agarkar G., Rathod D., Dahm H., Rai M. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity // *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 2015, 108(2):267-289.
80. Gorban A.N., Zinovyev A. Principal manifolds and graphs in practice: from molecular biology to dynamical systems // *Int. J. Neural Syst.*, 2010, 20(3): 219-232.
81. Graham L., Graham J., Wilcox L. *Plant Biology*. First edition // Prentice Hall, 2003: 497 p.
82. Gu Q., Luo H., Zheng W., Liu Z., Huang Y. *Pseudonocardia oroxyli* sp. nov., a novel actinomycete isolated from surface-sterilized *Oroxylum indicum* root // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, 56(9): 2193-2197.
83. Gu Q., Zheng W., Huang Y. *Glycomyces sambucus* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Sambucus adnata* Wall. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, 57(9): 1995-1998.
84. Guo B., Wang Y., Sun X., Tang K. Bioactive natural products from endophytes: a review // *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2008, 44(2):153-158.

85. Gurung T.D., Sherpa C., Agrawal V.P., Lekhak B. Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region // Nepal J. Science and Technol., 2009, 10: 173-182.
86. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F., Kloepper J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops // Can. J. Microbiol., 1997, 43: 895-914.
87. Hallmann J., Berg G., Berg B. Isolation Procedures for Endophytic Microorganisms. In: Barbara J. E. Schulz, Christine J. C. Boyle, Thomas N. Sieber (eds) Microbial root endophytes // Springer, New York, 2006, pp. 299-314.
88. Han J., Sun L., Dong X., Cai Z., Sun X., Yang H., Wang Y., Song W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens // Syst. Appl. Microbiol., 2005, 28(1): 66-76.
89. Hardoim P. R., van Overbeek L. S., van Elsas J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth // Trends in Microbiol., 2008, 16(10): 463-471.
90. Hasegawa S., Meguro A., Shimizu M., Nishimura T., Kunoh H. Endophytic Actinomycetes and Their Interactions with Host Plants // Actinomycetologica, 2006, 20:72–81.
91. Hayakawa M., Sadakata T., Kajiura T., Nonomura H. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil // J. Ferm. and Bioengineer., 1991a, 72(5): 320-326.
92. Hayakawa M., Kajiura T., Nonomura H. New methods for the highly selective isolation of *Streptosporangium* and *Dactylosporangium* from soil // J. Ferment. Bioengineer., 1991b, 72(5): 327–333.

93. Hayakawa M., Momose Y., Yamazaki T., Nonomura H. A method for the selective isolation of *Microtetraspora glauca* and related four-spored actinomycetes from soil // J. Appl. Bacteriol., 1996, 80(4): 375–386.
94. Hayakawa M., Iino H., Takeuchi S., Yamazaki T. Application of a method incorporating treatment with chloramine-T for the selective isolation of *Streptosporangiaceae* from soil // J. Ferment. Bioengin., 1997, 84(6): 599–602.
95. Herbert E. J., Donald G. C. "Indole-3-acetic Acid" // Org. Synth.44: 64.; Coll., 1964, 5: p. 654.
96. Hop D. V., Sakiyama Y., Binh C. T. T., Otoguro M., Hang D. T., Miyadoh S., Luong D. T., Ando K.. Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity // J. Antibiot., 2011, 64: 599–606
97. Hu J., Li Y., Wang L., Xue Y. Biological characteristics and biological activity of soil microorganisms from Antarctic King George Island // Acta. Microbiol. Sin., 1993, 32(3): 151 – 156.
98. Huang S.X., Yu Z., Robert F., Zhao L.X., Jiang Y., Duan Y., Pelletier J., Shen B. Cycloheximide and congeners as inhibitors of eukaryotic protein synthesis from endophytic actinomycetes *Streptomyces* sps. YIM56132 and YIM56141. // J. Antibiot. (Tokyo)., 2011, 64(1):163-166.
99. Huang X .L., Zhuang L., Lin H. P., Li ., Goodfellow M. and Hong K.. Isolation and bioactivity of endophytic filamentous actinobacteria from tropical medicinal plants. // Afr. J. Biotechnol., 2012, 11(41): 9855-9864
100. Igarashi Y., Iida T., Yoshida R., Furumai T. Pteridic acids A and B, novel plant growth promoters with auxin-like activity from *Streptomyces hygrosopicus* TP-A0451. // J. Antibiot. (Tokyo)., 2002, 55(8):764-767.

101. Igarashi Y., Miura S.S., Fujita T., Furumai T. Pterocidin, a cytotoxic compound from the endophytic *Streptomyces hygrosopicus*. // J. Antibiot. (Tokyo)., 2006, 59(3):193-195.
102. Igarashi Y., Tanaka Y., Ikeda M., Oikawa T., Kitani S., Nihira T., Mongkol P., Janhom M., Panbangred W. Prajinamide, a new modified peptide from a soil-derived *Streptomyces*. // J. Antibiot. (Tokyo)., 2012, 65(3):157-159.
103. Inahashi Y., Matsumoto A., Danbara H., Omura S., Takahashi Y. *Phytohabitans suffuscus* gen. nov., sp. nov., an actinomycete of the family *Micromonosporaceae* isolated from plant roots. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2010, 60(11): 2652-2658.
104. Indananda C., Matsumoto A., Inahashi Y., Takahashi Y., Duangmal K., Thamchaipenet A. *Actinophytocola oryzae* gen. nov., sp. nov., isolated from the roots of *Thai glutinous* rice plants, a new member of the family *Pseudonocardiaceae*. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2010, 60(5):1141-1146.
105. Indananda C., Thamchaipenet A., Matsumoto A., Inahashi Y., Duangmal K., Takahashi Y. *Actinoallomurus oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from roots of a *Thai jasmine* rice plant. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2011, 61(4):737-741.
106. Janso J.E., Carter G.T. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. // Appl. Environ. Microbiol., 2010, 76(13): 4377-86.
107. Kaewkla O., Franco C.M. *Nocardia callitridis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized root of an Australian native pine tree. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2010a, 60(7):1532-1536.
108. Kaewkla O., Franco C.M. *Pseudonocardia adelaidensis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of a grey

- box tree (*Eucalyptus microcarpa*) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2010b, 60(12): 2818-2282.
109. Kaewkla O., Franco CM. *Pseudonocardia eucalypti* sp. nov., an endophytic actinobacterium with a unique knobby spore surface, isolated from roots of a native Australian eucalyptus tree. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2011a, 61(4):742-746.
  110. Kaewkla O., Franco C.M. *Actinopolymorpha pittospori* sp. nov., an endophyte isolated from surface-sterilized leaves of an apricot tree (*Pittosporum phylliraeoides*). // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2011b, 61(11): 2616-2620.
  111. Khanna M., Solanki R., Lal R. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. // Int. J. Advan. Biotech. Research, 2011, 2 (3): 357-375.
  112. Kim N., Shin J.C., Kim W., Hwang B.Y., Kim B.S., Hong Y.S., Lee D. Cytotoxic 6-alkylsalicylic acids from the endophytic *Streptomyces laceyi*. // J. Antibiot. (Tokyo)., 2006, 59(12): 797-800.
  113. Koyama R., Matsumoto A., Inahashi Y., Omura S., Takahashi Y. Isolation of actinomycetes from the root of the plant, *Ophiopogon japonicus*, and proposal of two new species, *Actinoallomurus liliacearum* sp. nov. and *Actinoallomurus vinaceus* sp. nov. // J. Antibiot. (Tokyo)., 2012, 65(7): 335-340.
  114. Krings M., Taylor T.N., Dotzler N. Fungal Endophytes as a Driving Force in Land Plant Evolution: Evidence from the Fossil Record. // Biocompl. Plant-Fungal Interact., 2012, p 5-25.
  115. Kumar N., Singh R. K., Mishra S.K., Singh A.K. , Pachouri U.C. Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria. // Int. J. Microbiol. Research, 2010, 2(2):12-16.



116. Kurtböke D.I., Chen C.F., Williams S.T. Use of polyvalent phage for reduction of streptomycetes on soil dilution plates. // *J. Appl. Bacteriol.*, 1992, 72(2):103-111.
117. Lechevalier H.A., Lechevalier M.P., Gerber N.N. Chemical composition as a criterion in the classification of actinomycetes. // *Adv. Appl. Microbiol.*, 1971, 14:47-72.
118. Lee J.C., Yang X., Schwartz M., Strobel G., Clardy J. The relationship between an endangered North American tree and an endophytic fungus. // *Chem. Biol.*, 1995, 2(11): 721-727.
119. Lee S.O., Choi G.J., Choi Y.H., Jang K.S., Park D.J., Kim C.J., Kim J.C. Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to *Plasmodiophora brassicae*. // *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 18(11): 1741-1746.
120. Lehr N.A., Schrey S.D., Hampp R., Tarkka M.T. Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. // *New Phytol.*, 2008, 177(4): 965-976.
121. Li J., Zhao G.Z., Chen H.H., Qin S., Xu L.H., Jiang C.L., Li W.J. *Rhodococcus cercidiphylli* sp. nov., a new endophytic actinobacterium isolated from a *Cercidiphyllum japonicum* leaf. // *Syst. Appl. Microbiol.*, 2008, 31(2):108-113.
122. Li J., Zhao G.Z., Qin S., Zhu W.Y., Xu L.H., Li W.J. *Streptomyces sedi* sp. nov., isolated from surface-sterilized roots of *Sedum* sp. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009a, 59(6):1492-1496.
123. Li J., Zhao G.Z., Qin S., Zhu W.J., Huang H.Y., Xu L.H., Jiang C. L., Li W.J. Application of endophytic actinobacteria to increase artemisinin content in *Artemisia annua* L. // 15<sup>th</sup> Int. Symp. Biol. Actinom. Abstr. Book, 2009b, p. 61

124. Li J., Zhao G.Z., Huang H.Y., Qin S., Zhu W.Y., Xu L.H., Li W.J. *Kineosporia mesophila* sp. nov., isolated from surface-sterilized stems of *Tripterygium wilfordii*. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2009c, 59(12): 3150-3154.
125. Li J., Zhao G.Z., Qin S., Huang H.Y., Zhu W.Y., Xu L.H., Li W.J. *Saccharopolyspora tripterygii* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Tripterygium hypoglaucum*. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2009d, 59(12): 3040-3044.
126. Li J., Zhao G.Z., Qin S., Zhu W.Y., Xu L.H., Li W.J. *Herbidospora osyris* sp. nov., isolated from surface-sterilized tissue of *Osyris wightiana* Wall. ex Wight. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2009e, 59(12): 3123-3127.
127. Li J., Lu C., Shen Y. Macrolides of the bafilomycin family produced by *Streptomyces* sp. CS. // J. Antibiot. (Tokyo), 2010, 63(10): 595-599.
128. Li J., Zhao G.Z., Huang H.Y., Zhu W.Y., Lee J.C., Xu L.H., Kim C.J., Li W.J. *Nonomuraea endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from *Artemisia annua* L. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2011, 61(4):757-761.
129. Liu N., Wang H., Liu M., Gu Q., Zheng W., Huang Y. *Streptomyces alni* sp. nov., a daidzein-producing endophyte isolated from a root of *Alnus nepalensis* D. Don. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2009, 59(2): 254-258.
130. Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.B., Taghavi S., Mezgeay M., van der Lelie D. Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. // Critical Reviews in Plant Sciences, 2002, 21(6): 583–606.
131. Long H.H., Schmidt D.D., Baldwin I.T. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. // PLoS One., 2008, 3(7): e2702.
132. Lu C.H., Shen Y.M. A new macrolide antibiotics with antitumor activity produced by *Streptomyces* sp. CS, a commensal microbe of *Maytenus hookeri*. // J Antibiot., 2003, 56: 415–418.

133. Lu C.H, Shen Y.M. Two new macrolides produced by *Streptomyces* sp. CS. // J. Antibiot., 2004, 57:597–600.
134. Lu C.H., Shen Y.M. A novel ansamycin, naphthomycin K from *Streptomyces* sp. // J. Antibiot., 2007, 60: 649–653.
135. Macagnan D., da S. Romeiro R., de Souza J. T., Pomella A. W. V. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. // Phytopathology/Mycology Phytoparasitica, 2006, 34(2): 122-132.
136. Madhaiyan M., Hu C.J., Kim S.J., Weon H.Y., Kwon S.W., Ji L. *Jatrophihabitans endophyticus* gen. nov., sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized stem of *Jatropha curcas* L. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2013, 63(4):1241-1248
137. Mattos K.A., Pádua V.L., Romeiro A., Hallack L.F., Neves B.C., Ulisses T.M., Barros C.F., Todeschini A.R., Previato J.O., Mendonça-Previato L. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. // An Acad. Bras. Cienc., 2008, 80(3):477-493.
138. Matsumoto A., Takahashi Y., Mochizuki M., Seino A., Iwai Y., Omura S.. Characterization of Actinomycetes Isolated from Fallen Leaves. // Actinomycetologica, 1998, 12(1): 46-48.
139. Miao Q., Qin S., Bian G.K., Yuan B., Xing K., Zhang Y.J., Li Q., Tang S.K., Li W.J., Jiang J.H. *Amycolatopsis endophytica* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from oil-seed plant *Jatropha curcas* L. // Antonie Van Leeuwenhoek, 2011, 100(3): 333-339.
140. Miller K.I., Qing C., Sze D.M., Roufogalis B.D., Neilan B.A. Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity. // Microb. Ecol., 2012, 64(2): 431-449.

141. Miquely E., Martin C., Manuel C. H., Manzanal B. Synchronous germination of *Streptomyces antibioticus* spores: Tool for the analysis of hyphal growth in liquid culters // FEMS Microbiol. Lett., 1993, 109(2-3): 123-130.
142. Mendes R., Pizzirani-Kleiner A.A., Araújo W.L., Raaijmakers J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. // Appl. Environ. Microbiol., 2007, 73(22): 7259-7267.
143. Moore F.P., Barac T., Borremans B., Oeyen L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Campbell C.D., Moore E.R. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. // Syst. Appl. Microbiol., 2006, 29(7): 539-556.
144. Nejad P., Johnson P.A. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. // Biol. Control., 2000, 18: 208–215.
145. Nimnoi P., Pongsilp N. Genetic diversity and plant-growth promoting ability of the indole-3-acetic acid (IAA) synthetic bacteria isolated from agricultural soil as well as rhizosphere, rhizoplane and root tissue of *Ficus religiosa* L., *Leucaena leucocephala* and *Piper sarmentosum* Roxb. // Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2009, 5 No(1): 29-41.
146. Nimnoi P., Pongsilp N., Lumyong S. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec. and screening of plant growth promoters production. // World J. Microbiol. Biotechnol., 2010, 26(2): 193-203.
147. Okazaki T. Studies on actinomycetes isolated from plant leaves. In: Kurtböke D.I. (ed) Selective isolation of rare actinomycetes. // Queensland Complete Printing Service, Australia, 2003, pp 102–121.

148. Oliveira M.F., da Silva M.G., Van Der Sand S.T. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. // Res. Microbiol., 2010, 161(7): 565-572.
149. Omarjee J., van Antwerpen T., Balandreau J., Kuniata L., Rutherford S. Isolation and characterisation of some endophytic bacteria from Papua New Guinea sugarcane. // Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass., 2004, 78: 189-193.
150. Onofre-Lemus J., Hernández-Lucas I. Girard L., Caballero-Mellado J. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. // Appl. Environ. Microbiol., 2009, 75(20): 6581-6590.
151. Ootoguro M., Hayakawa M., Yamazaki T., Iimura Y. An integrated method for the enrichment and selective isolation of *Actinokineospora* spp. in soil and plant litter // J. Appl. Microbiol., 2001., 91(1): 118-130.
152. Passari A.K., Mishra V.K., Saikia R., Gupta V.K., Singh B.P. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. // Front. Microbiol., 2015, 6: 273.
153. Pirttila A., Joensuu P., Pospiech H., Jalonen J., Hohtola A. Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures // Physiol. Plant., 2004, V.121., P. 305–312.
154. Posada F., Vega F.E. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). // Mycologia., 2005, 97(6):1195-1200.
155. Pujiyanto S., Lestari Y., Suwanto A., Budiarti S., Darusman L.K. Alpha-glucosidase inhibitor activity and characterization of endophytic actinomycetes

- isolated from some Indonesian diabetic medicinal plants. // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2012, 4(1):327–333.
156. Qin S., Li ., Zhao G.Z., Chen H.H., Xu L.H., Li W.J. *Scharopolyspora endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycetes isolated from the root of *Maytenus austroyunnanensis*. // *Syst. Appl. Microbiol.*, 2008, 31:352–357.
157. Qin S., Li ., Chen H.H., Zhao G.Z., Zhu W.Y., Jiang C.L., Xu L.H., Li W.J. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75: 6176-6186.
158. Qin S., Xing K., Jiang J.H., Xu L.H., Li W.J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 89: 457–473
159. Qiu F.B, Huang Y., Sun L., Zhang X.X., Liu Z.H., Song W. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, 57:405-408.
160. Redman R.S., Sheehan K.B., Stout R.G., Rodriguez R.J., Henson J.M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. // *Science*, 2002, 298(5598): 1581.
161. Rosenblueth M., Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts // *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, 2006, 19(8):827-837.
162. Ryan R.P., Ryan D., Dowling D.N. Plant protection by the recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* F113rifPCB strain expressing arsenic resistance: improving rhizoremediation // *Lett. Appl. Microbiol.*, 2007, 45(6):668-6674.
163. Ryan R.P, Germaine K., Franks A., Ryan D.J, Dowling D.N. Bacterial endophytes: recent development and applications. // *FEMS Micribiol. Lett.*, 2008, 278:1–9

164. Saikkonen K., Wäli P., Helander M., Faeth S.H. Evolution of endophyte-plant symbioses. // *Trends Plant Sci.*, 2004, 9(6):275-280.
165. Sardi P., Saracchi M., Quaroni S., Petrolini B., Borgonovi G. E., Merli S. Isolation of Endophytic *Streptomyces* strains from Surface-Sterilized Roots. // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, p. 2691-2693.
166. Schreiber D., Jung M., Sandjo L.P., Liermann J.C., Opatz T., Erkel G. 3'-Demethyldihydromaldoxin and dihydromaldoxin, two anti-inflammatory diaryl ethers from a *Steganospora species*. // *J. Antibiot.*, 2012, 65: 473-477.
167. Sessitsch A., Reiter B., Berg G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth promoting and antagonistic abilities. // *Can. J. Microbiol.*, 2004, 50:239– 249.
168. Shimizu M., Nakagawa Y., Sato Y., Furumai T., Igarashi Y., Onaka H., Yoshida R., Kunoh H. Studies on Endophytic Actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. Isolated from Rhododendron and Its Antifungal Activity. // *J. Gen. Plant Path.*, 2000, 66(4): 360-366.
169. Siciliano S.D., Fortin N., Mihoc A., Wisse G., Labelle S., Beaumier D., Ouellette D., Roy R., Whyte L.G., Banks M.K., Schwab P., Lee K., Greer C.W. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67(6):2469-2475.
170. Song G.C., Yasir M., Bibi F., Chung E.J., Jeon C.O., Chung Y.R. *Nocardioides caricicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from a halophyte, *Carex scabrifolia Steud.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2011, 61(1):105-109.
171. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. // *FEMS Microbiol Rev.*, 2007, 31(4):425-448.

172. Sriprechasak P., Tanasupawat S., Matsumoto A., Inahashi Y., Suwanborirux K., Takahashi Y. Identification and antimicrobial activity of actinobacteria from soils in southern Thailand. // *Trop. Biomed.*, 2013, 30(1):46-55.
173. Stackebrandt E., Schumann P. Firmicutes with high GC content of DNA. *The Prokaryotes. Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes* // *Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria*, 2006, pp. 297-321.
174. Staniek A., Woerdenbag H.J., Kayser O. Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. // *J. Plant. Interact.*, 2008, 3:75–93
175. Strobel A., Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003, 67:491–502
176. Strobel G. Harnessing endophytes for industrial microbiology. // *Current Opinion in Microbiology* 2006, 9:240–244
177. Stutzenberger F. Extracellular enzyme production by *Thermomonospora curvata* grown on bagasses // *J. Industrial. Microbiol.*, 1994, 13(1): 35-42.
178. Sulistiyani T. R., Lisdiyanti P., Lestari Y. Population and Diversity of Endophytic Bacteria Associated with Medicinal Plant *Curcuma zedoaria*. // *Indonesia Microbiol.*, 2014, 8(2): 65-72
179. Surette M.A., Sturz A.V., Lada R.R., Nowak J. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota L. var. sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. // *Plant Soil*, 2003, 253:381–390.
180. Suzuki S.I., Okuda T., Komatsubara S. Selective isolation and distribution of the genus *Planomonospora* in soil // *Can. J. Microbiol.*, 2001, 47(3): 253-263.



181. Taechowisan T., Peberdy J.F., Lumyong S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. // *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 19:381–385.
182. Taechowisan T., Lu C., Shen Y., Lumyong S. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. // *Microbiology*, 2005, 151:1691–1695.
183. Taechowisan T., Wanbanjob A., Tuntiwachwuttikul P., Taylor W.C. Identification of *Streptomyces* sp. Tc022, an endophyte in *Alpinia galanga*, and the isolation of actinomycin. D. // *Ann. Microbiol.*, 2006, 56(2): 113–117.
184. Taechowisan T., Lu C.H., Shen Y.M., Lumyong S. Antitumor activity of 4-arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130. // *J. Cancer Res. Trer.*, 2007a, 3:86–91.
185. Taechowisan T., Lu C.H., Shen Y.M., Lumyong S. 4-arylcoumarin inhibits immediate-type allergy. // *Food Agric Immunol.*, 2007b, 18:203–211.
186. Taechowisana T., Wanbanjob A., Tuntiwachwuttikul P., Liu J.K. Anti-inflammatory activity of lansais from endophytic *Streptomyces* sp. SUC1 in LPS-induced RAW 264.7 cells. // *Food Agric Immunol.*, 2009, 20:67–77.
187. Tan H.M., Cao L.X., He Z.F., Su G.J., Lin B., Zhou S.N. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* in vitro. // *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 22:1275–1280.
188. Tanvir R., Sajid I., Hasnain S. Larvicidal potential of *Asteraceae* family endophytic actinomycetes against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. // *Nat. Prod. Res.*, 2014, 28(22):2048–2052.
189. Tapia-Hernández A., Bustillos-Cristales M.R., Jiménez-Salgado T., Caballero-Mellado J., Fuentes-Ramírez L.E. Natural Endophytic Occurrence of

- Acetobacter diazotrophicus* in Pineapple Plants. // *Microb. Ecol.*, 2000, 39(1):49-55.
190. Thamchaipenet A., Duangmal K., Indananda C., Bunyoo C., Matsumoto A., Takahashi Y. Endophytic actinomycetes from Thai agricultural and medicinal plants as sources for discovery of novel genus and species. // 15<sup>th</sup> Internat. Sympos. Biology Actinom., 2009, p. 3-29.
191. Thamchaipenet A., Indananda C., Bunyoo C., Duangmal K., Matsumoto A., Takahashi Y. *Actinoallomurus acaciae* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from *Acacia auriculiformis* A.Cunn. ex Benth. in Thailand. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, 60:554-559.
192. Tian X.L., Cao L.X., Tan H.M., Han W.Q., Chen M., Liu Y.H., Zhou S.N. Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. // *Microb. Ecol.*, 2007, 53:700– 707.
193. Trujillo M.E., Kroppenstedt R.M., Schumann P., Carro L., Martynez-Molina E. *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006,56:2381-2385.
194. Trujillo M.E., Kroppenstedt R.M., Fernandez-Molinero C., Schumann P., Martynez-Molina E. *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, 57:2799-2804.
195. Tuntiwachwuttikul P., Taechowisan T., Wanbanjob A., Thadaniti S., Taylor W.C. Lansai A–D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC1. // *Tetrahedron*, 2008, 64:7583–7586.
196. Velazquez E., Rojas M., Lorite M.J., Rivas R., Zurdo-Pineiro J.L., Heydrich M., Bedmar E.J. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. // *J. Basic. Microbiol.*, 2008, 48:118–1124

197. Verma V.C., Gond S.K., Kumar A., Mishra A., Kharwar R.N., Gange A.C. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss: isolation, diversity, and anti-microbial activity. // *Microb Ecol.*, 2009, 57:749–756
198. Viswanathan R. , Rajitha R. , Ramesh Sundar A. , Ramamoorthy V. Isolation and identification of endophytic bacterial strains from sugarcane stalks and their *in vitro* antagonism against the red rot pathogen.// [Sugar Tech.](#), 2003, 5(1): 25-29.
199. Wang P., Kong F., Wei J., Wang Y., Wang W., Hong K., Zhu W. Alkaloids from the mangrove-derived actinomycete *Jishengella endophytica* 161111. // *Mar. Drug.*, 2014, 12:477–490.
200. Xie Q.Y., Wang C., Wang R., Qu Z., Lin H.P., Goodfellow M., Hong K. *Jishengella endophytica* gen. nov., sp. nov., a newmember of the family *Micromonosporaceae*.// *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2011, 61(5):1153-1159.
201. Xing K., Qin S., Fei S.M., Lin Q., Bian G.K., Miao Q., Wang Y., Cao C.L., Tang S.K., Jiang J.H., Li W.J. *Nocardia endophytica* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from oil-seed plant *Jatropha curcas* L. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2011, 61(8):1854-1858.
202. Xiong Z.J., Zhang J.L., Zhang D.F., Zhou Z.L., Liu M.J., Zhu W.Y., Zhao L.X., Xu L.H., Li W.J. *Rothia endophytica* sp. nov., an actinobacterium isolated from *Dysophylla stellata* (Lour.) Benth. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2013, 63(11):3964-3969.
203. Yamaguchi T. Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. // *J Bacteriol.*, 1965, 89:444-453.
204. Yu Z., Zhao L.-X., Jiang C., Duan Y., Wong L., Carver K., Shuler L. and Shen B. Bafilomycins produced by an endophytic actinomycete *Streptomyces* sp. YIM56209. // *J. of Antibiot.*, 2011, 64: 159-162.

205. Yuan H.M., Zhang X.P., Zhao K., Zhong K., Gu Y.F., Lindstrom K. Genetic characterisation of endophytic actinobacteria isolated from the medicinal plants in Sichuan. // *Ann. Microbiol.*, 2008, 58(4):597–604
206. Yue Q., Miller C.J., White J.F. Jr., Richardson M.D. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. // *J. Agric. Food. Chem.*, 2000, 48(10):4687-4692.
207. Zhang H.W, Song Y.C, Tan R.X. Biology and chemistry of endophytes. // *Nat. Prod. Rep.*, 2006, 23:753–771.
208. Zhao P.J, Fan L.M, Li G.H, Zhu N, Shen Y.M. Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp. ls9131. // *Arch Pharm Res.*, 2005, 28:1228–1232
209. Zhao G.Z, Li ., Qin S., Huang H.Y, Zhu W.Y, Xu L.H, Li W.J. *Streptomyces artemisiae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from surface-sterilized *Artemisia annua* L. tissue. // *Int J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, 60:27–32
210. Zhao K., Penttinen P., Guan T.W., Xiao J., Chen Q., Xu J., Lindström K., Zhang L.L., Zhang X.P., Strobel A. The diversity and antimicrobial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China. // *Curr. Microbiol.*, 2011, 62: 182-190.
211. Zhou H., Yang Y., Zhang J., Peng T., Zhao L., Xu L., Ding Z. Alkaloids from an endophytic *Streptomyces* sp. YIM66017. // *Nat. Prod. Commun.*, 2013, 8(10): 1393–1396.
212. Zhou H, Yang Y, Peng T, Li W, Zhao L, Xu L, Ding Z. Metabolites of *Streptomyces* sp., an endophytic actinomycete from *Alpinia oxyphylla* // *Nat. Prod. Res.*, 2014, 28(4): 265–267.
213. Zin N.M, Sarmin N.I.M., Ghadin N., Basri D.F., Sidik N.M., Hess W.M., Strobel A. Bioactive endophytic streptomycetes from the Malay Peninsula. // *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, 274:83–88

214. Zinniel D.K., Lambrecht P., Harris N.B., Feng Z., Kuczmarski D., Higley P., Ishimaru C.A., Arunakumari A., Barletta R.G., Vidaver A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(5):2198-2208.

**Приложение. СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД**

<b>Органическая среда 2 Гаузе (модификация*):</b>	триптон – 3,0 г	NaCl – 5,0 г
	пептон – 5,0 г	агар – 20,0 г
	глюкоза – 10,0 г	вода – 1000 мл
pH=7,2 – 7,4		

<b>Жидкая органическая среда 2 Гаузе (модификация*):</b>	триптон – 3,0 г	NaCl – 5,0 г
	пептон – 5,0 г	вода – 1000 мл
	глюкоза – 10,0 г	
pH=7,2 – 7,4		

<b>Овсяный агар:</b>	овсяная мука – 20,0 г
	вода – 1000 мл
	агар – 20,0 г
	pH=7,2

<b>Минеральный агар 1 Гаузе (синтетическая среда):</b>	крахмал – 20,0 г	NaCl – 0,5 г
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,5 г	агар – 20,0 г
	MgSO <sub>4</sub> – 0,5 г	вода – 1000 мл
	FeSO <sub>4</sub> – 0,01 г	

---

\* В модифицированной среде используют триптон вместо бульона Хоттингера в количестве, эквивалентном по содержанию азота.

pH=7,2 – 7,4

**Среда 6613:**KNO<sub>3</sub> – 4,0 г

NaCl – 0,5 г

CaCO<sub>3</sub> – 5,0 гдрожжевой экстракт  
– 2,5 г

крахмал – 20,0 г

вода – 1000 мл

pH=7,0

**Среда 330:**

крахмал – 20,0 г

NaCl – 0,5 г

горох – 0,5 г

CaCO<sub>3</sub> – 5,0 г

сахароза – 0,5 г

вода – 1000 мл

NaNO<sub>3</sub> – 5,0 г

pH=7,0

**Среда «Сах»:**

сахароза – 20,0 г

NaCl – 3,0 г

соя – 10,0 г

CaCO<sub>3</sub> – 3,0 гKNO<sub>3</sub> – 2,0 г

вода – 1000 мл

pH=7,0

**Среда 2663:**

соя – 15,0 г

NaCl – 2,0 г

глицерин – 30,0 г

CaCO<sub>3</sub> – 5,0 г

вода – 1000 мл

pH=7,0

**Среда 11654:**

соя – 20,0 г	NaCl – 3,0 г
глюкоза – 30,0 г	CaCO <sub>3</sub> – 3,0 г
вода – 1000 мл	

pH=7,4

**Среда А<sub>4</sub>:**

соя – 10,0 г	NaCl – 5,0 г
глюкоза – 10,0 г	CaCO <sub>3</sub> – 2,5 г
вода – 1000 мл	

pH=7,2 - 7,4

**Жидкая органическая среда 2 Гаузе****с мелом:**

триптон – 3,0 г	NaCl – 5,0 г
пептон – 5,0 г	CaCO <sub>3</sub> – 2,5 г
глюкоза – 10,0 г	вода – 1000 мл

pH=7,2 – 7,4

**Среда 5339:**

соя – 5,0 г	NaCl – 3,0 г
глицерин – 20,0 г	CaCO <sub>3</sub> – 2,0 г
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 1,5 г	вода – 1000 мл

pH=6,8



**Среда «тобрекс»:**

глюкоза – 40,0 г	KCl – 0,5 г
пептон – 10,0 г	NaNO <sub>3</sub> – 3,0 г
MgSO <sub>4</sub> – 1,5 г	FeSO <sub>4</sub> – 10,0 мг
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2,0 г	вода дистиллированная – 1000 мл

pH=5,2