

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
имени Г.Ф. Гаузе»

На правах рукописи

ЕФИМЕНКО Татьяна Александровна

**Бактериальные продуценты антибиотиков, активных в отношении
микроорганизмов с лекарственной устойчивостью**

Специальность 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., профессор,
заслуженный деятель науки РФ
Терехова Л.П.

Москва 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Проблема лекарственной устойчивости патогенных микроорганизмов....	15
1.2. Механизмы формирования антибиотикорезистентности.....	23
1.3. Продуценты антибиотиков разных таксономических групп.....	26
1.4. Бактерии как источник антибиотиков.....	42
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	56
2.1. Объекты исследования.....	56
2.2. Питательные среды и условия культивирования.....	57
2.3. Выделение бактерий из природной среды.....	58
2.3.1. Выделение бактерий из почвы.....	58
2.3.2. Выделение бактерий из плодовых тел базидиальных грибов.....	59
2.4. Тест-штаммы для определения антибиотической активности.....	61
2.5. Определение антибиотической активности.....	61
2.6. Микроскопирование.....	62
2.7. Видовая идентификация штаммов-продуцентов на основании анализа последовательности гена 16S рРНК.....	64
2.7.1. Выделение геномной ДНК из бактериальных клеток с использованием набора PowerSoil DNA Kit.....	64
2.7.2. Выделение геномной ДНК из бактериальных клеток с использованием набора BioSilica	65
2.7.3. Амплификация гена 16S рРНК.....	66
2.7.4. Секвенирование фрагментов ДНК.....	67
2.7.5. Анализ генных последовательностей ДНК.....	67
2.8. Хранение бактериальных продуцентов антибиотиков.....	68
2.9. Статистическая обработка результатов.....	69

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	70
3.1. Подбор тест-системы для отбора штаммов – продуцентов антибиотиков..	70
3.2. Выделение бактерий из различных природных источников и изучение потенциальных продуцентов антибиотиков.....	71
3.2.1. Бактерии – продуценты антибиотиков, выделенные из почвы Краснодарского края.....	72
3.2.2. Бактерии – продуценты антибиотиков, выделенные из многолетнемерзлой почвы Антарктики.....	76
3.2.3. Бактерии – продуценты антибиотиков, выделенные из плодовых тел базидиальных грибов.....	81
3.2.4. Анализ полученных данных по различным источникам бактерий – продуцентов антибиотиков.....	90
3.3. Изучение наиболее перспективных штаммов бактерий – продуцентов антибиотиков.....	100
3.3.1. Штаммы <i>Bacillus subtilis</i> INA 01085 и INA 01086 – продуценты полиеновых и пептидных антибиотиков.....	100
3.3.2. Штамм <i>Bacillus pumilus</i> INA 01087 – продуцент антибиотиков группы амикумацина.....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119
ПРИЛОЖЕНИЯ	137

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АМП – антимикробные пептиды;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- МЛУ – множественная лекарственная устойчивость;
- МПК – минимальная подавляющая концентрация;
- ТСХ – тонкослойная хроматография;
- АТСС – American Type Culture Collection, Американская коллекция типовых культур;
- ESBL – extended spectrum beta-lactamases, бета-лактамазы расширенного спектра;
- FDA – U.S. Food and Drug Administration, Управление по контролю за продуктами и лекарствами США;
- INA – акроним Коллекции культур микроорганизмов ФГБНУ «НИИНА»;
- MRSA – methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, метициллинрезистентный золотистый стафилококк;
- MSSA – methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, метициллинчувствительный золотистый стафилококк;
- MDR – multidrug resistance, множественная лекарственная устойчивость;
- NCTC – National Collection of Type Cultures, Национальная коллекция типовых культур (Великобритания);
- PDR – pan-drug-resistance, панрезистентность;
- R – resistance, резистентность;
- RIA – Research Institute for Antibiotics, Коллекция культур Института антибиотиков (Россия);
- RDP – Ribosomal Database Project, проект “Рибосомальная База”;
- VISA – vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*, золотистый стафилококк с промежуточной устойчивостью к ванкомицину;

VKPM (VKPM) – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов;

VR – vancomycin-resistance, устойчивость к ванкомицину;

VRE – vancomycin-resistant enterococci, энтерококки, устойчивые к ванкомицину;

VRSA – vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, ванкомицин-резистентный золотистый стафилококк;

XDR – extensively drug-resistant, экстенсивная устойчивость.

СОКРАЩЕНИЯ НАЗВАНИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
<i>Ach. spanius</i>	<i>Achromobacter spanius</i>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>B. brevis</i>	<i>Bacillus brevis</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>B. halodurans</i>	<i>Bacillus halodurans</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>B. mojavensis</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>
<i>B. mycoides</i>	<i>Bacillus mycoides</i>
<i>B. polymyxa</i>	<i>Bacillus polymyxa</i>
<i>B. pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>B. safensis</i>	<i>Bacillus safensis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>C. terrigena</i>	<i>Comamonas terrigena</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Ew. americana</i>	<i>Ewingella americana</i>
<i>H. paralvei</i>	<i>Hafnia paralvei</i>
<i>J. agaricidamnosum</i>	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>
<i>J. lividum</i>	<i>Janthinobacterium lividum</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>L. mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>M. epidermidis</i>	<i>Micrococcus epidermidis</i>

<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>M. terreus</i>	<i>Micrococcus terreus</i>
<i>Myc. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Myc. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>N. autotrophica</i>	<i>Nocardia autotrophica</i>
<i>N. coeliaca</i>	<i>Nocardia coeliaca</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Sac. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>St. maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>St. rhizophila</i>	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
<i>Str. albogriseolus</i>	<i>Streptomyces albogriseolus</i>
<i>Str. cattleya</i>	<i>Streptomyces cattleya</i>
<i>Str. clavuligerus</i>	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
<i>Str. fradiae</i>	<i>Streptomyces fradiae</i>
<i>Str. griseus</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Str. lincolnensis</i>	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
<i>Str. olivaceus</i>	<i>Streptomyces olivaceus</i>
<i>Str. peucetius</i>	<i>Streptomyces peucetius</i>
<i>Str. roseosporus</i>	<i>Streptomyces roseosporus</i>
<i>Str. verticillus</i>	<i>Streptomyces verticillus</i>
<i>Strep. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Strep. dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>Strep. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Strep. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Strep. salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение в медицинскую практику таких мощных лекарственных средств как антибиотики было настоящей революцией в лечении инфекционных заболеваний. Однако по мере их применения ответной реакцией патогенных микроорганизмов была выработка лекарственной устойчивости к антибиотикам – антибиотикорезистентности. В настоящее время в медицине все острее встает проблема неэффективности антибиотиков, поэтому *актуальной задачей* является изыскание новых соединений, преодолевающих лекарственную устойчивость патогенных микроорганизмов, которые могли бы пополнить существенно уменьшившийся арсенал лекарственных средств.

Проблема быстрого распространения антибиотикорезистентности среди патогенных микроорганизмов носит глобальный характер – по данным ВОЗ с 2000 по 2015 год в мире было описано только 30 новых антибиотиков, одобренных национальными агентствами [Butler et al., 2013]. Такое незначительное количество антибактериальных соединений, введенных в медицинскую практику, требует внедрения новых подходов к изысканию природных антибиотиков. В последнем заключении ВОЗ от 25.02.2017 подчеркивается острая необходимость в интенсификации работ по созданию новых антибиотиков медицинского назначения для решения проблемы антибиотикорезистентности¹.

Если рассматривать антибиотики в качестве химического оружия в межвидовой борьбе за существование образующих их организмов, то наиболее перспективным источником штаммов-продуцентов является такой сложный биоценоз как почва. Действительно, на протяжении десятилетий основным объектом поиска продуцентов новых антибиотиков была почва, представляющая сложное сообщество организмов разных систематических групп, из которых

¹ URL: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1

самыми перспективными и хорошо изученными продуцентами были актинобактерии [Bérdu, 2005]. В настоящее время поиск расширяется, и исследуются самые разнообразные биоценозы, например, донные отложения, микробиота кишечника беспозвоночных, симбионты морских организмов, эндобионты растений, экскременты летучих мышей и др. [Chin et al., 2006; Laatsch, 2006; Blunt et al., 2011; Bérdu, 2012; Nordenfjäll, 2014]. При этом направление поиска продуцентов новых антибиотиков сместилось в сторону других, менее изученных по сравнению с актинобактериями, таксономических групп организмов, в том числе бактерий других таксонов. Настоящая работа посвящена изысканию в различных природных источниках бактерий – продуцентов антибиотиков, активных в отношении антибиотикорезистентных форм патогенов.

Цель и задачи исследования

Цель исследования заключалась в изыскании бактерий – продуцентов антибиотиков, активных в отношении микроорганизмов с лекарственной устойчивостью к антибиотикам медицинского назначения (антибиотикорезистентных микроорганизмов).

Для выполнения указанной цели данного исследования были поставлены следующие *задачи*:

1. Подобрать тест-систему, основанную на тест-штаммах различного систематического положения и обладающих разным уровнем антибиотикорезистентности, для отбора перспективных продуцентов антибиотиков, обладающих активностью в отношении микроорганизмов с лекарственной устойчивостью.

2. Выделить из различных природных источников бактериальные штаммы – потенциальные продуценты антибиотиков.

3. Выявить продуценты антибиотиков и отобрать наиболее перспективные по антимикробному спектру и уровню биосинтеза.

4. Определить видовую принадлежность и филогенетическое положение штаммов – продуцентов антибиотиков, преодолевающих антибиотикорезистентность тест-штаммов.

5. Создать коллекцию бактериальных продуцентов антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость.

6. Нарботать для химического изучения антибиотически активные вещества, синтезируемые наиболее перспективными продуцентами.

Новизна результатов

В результате скрининга 32 природных изолятов бактерий, выделенных из многолетнемерзлой почвы Антарктики, впервые обнаружена противомикробная активность в отношении антибиотикорезистентных тест-штаммов у представителей видов *B. mojavensis*, *B. licheniformis* и *B. safensis*.

Проведен анализ антимикробной активности 93 штаммов бактерий – эндобионтов плодовых тел базидиальных грибов и впервые установлено, что среди бактериальных эндобионтов высок процент продуцентов антибиотиков (84,9%).

Впервые описаны в качестве эндобионтов плодовых тел базидиальных грибов виды *Ach. spanius*, *B. licheniformis*, *H. paralvei*, *M. terreus*, *N. coeliaca*, *St. rhizophila*.

Впервые установлено, что представители видов *Ach. spanius*, *Ew. americana*, *H. paralvei*, *M. terreus*, *N. coeliaca*, *St. rhizophila* обладают способностью к образованию антимикробных веществ.

Установлено наличие двух новых пептидных антибиотиков у эндобионтных штаммов *B. subtilis* INA 01085 и INA 01086, выделенных из одного плодового тела гриба чешуйчатки обыкновенной (*Pholiota squarrosa* (OEDER) P.KUMM, 1871).

Получен и запатентован штамм *B. pumilus* INA 01110 – продуцент антибиотика амикумацина А. Впервые показано, что амикумацин А активен в

отношении тест-штамма *Myc. smegmatis* mc² 155, используемого на предварительном этапе скрининга противотуберкулезных средств.

Научно-практическая значимость исследования

Проведен анализ антибиотической активности 329 штаммов бактерий из различных экологических систем, и выделены штаммы-продуценты антибиотиков, активных в отношении метициллинрезистентного золотистого стафилококка (MRSA), штамма *L. mesenteroides* VKPM B-4177, устойчивого к антибиотикам группы ванкомицина (VR), и штамма синегнойной палочки (*P. aeruginosa* ATCC 27853) с множественной лекарственной устойчивостью.

Установлено, что плодовые тела базидиомицетов можно рассматривать в качестве перспективного источника бактериальных продуцентов антибиотиков, в том числе, преодолевающих антибиотикорезистентность патогенных бактерий.

Собрана коллекция штаммов – продуцентов антибиотиков, преодолевающих антибиотикорезистентность, а также штаммов – представителей видов, у которых ранее образование антибиотиков описано не было. На основании культурально-морфологических и генетических признаков 31 штамм идентифицирован, описан и заложен на длительное хранение в лиофилизированном виде в Коллекцию культур микроорганизмов ФГБНУ «НИИНА» и в Коллекцию продуцентов антибиотиков Сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий, ФГБНУ «НИИНА». Созданная коллекция является основой для дальнейшей работы по созданию новых антибиотиков медицинского назначения для борьбы с антибиотикорезистентными патогенными бактериями.

Выделены и описаны 2 штамма *B. subtilis* INA 01085 и INA 01086 – продуценты пептидных антибиотиков, активных в отношении грамположительных тест-бактерий, и полиеновых антибиотиков, обладающих активностью в отношении тест-штаммов грамположительных бактерий и грибов.

Согласно анализу литературы, пептидные антибиотики с таким набором аминокислот описаны впервые.

Выделен и описан штамм *B. pumilus* INA 01087 – продуцент антибиотика амикумацина А, разработана технология получения амикумацина А путем биосинтеза, получен патент РФ на селекционный штамм и способ получения амикумацина А.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Подобрана тест-система для отбора продуцентов антибиотиков, в соответствии с которой изучена антибиотическая активность 329 штаммов бактерий, выделенных из различных источников. Установлено, что 103 штамма образуют антимикробные вещества.

2. Определена видовая принадлежность и филогенетическое положение 31 штамма – продуцента антибиотиков.

3. Среди бактериальных штаммов, выделенных из многолетнемерзлой почвы Антарктики, выявлены продуценты антибиотиков, активных в отношении антибиотикорезистентных микроорганизмов. У представителей видов *B. mojavensis* и *B. licheniformis* описана антимикробная активность в отношении штамма *L. mesenteroides* VKPM B-4177 (VR), а у вида *B. safensis* – в отношении антибиотикорезистентных патогенных бактерий.

4. Установлен высокий процент продуцентов антибиотиков (84,9%) среди бактериальных эндобионтов плодовых тел базидиальных грибов. Описаны культуры видов *Ach. spanius*, *B. licheniformis*, *H. paralvei*, *M. terreus*, *N. coeliaca*, *St. rhizophila*, которые ранее не были описаны в качестве эндобионтов. У представителей видов *Ach. spanius*, *Ew. americana*, *H. paralvei*, *M. terreus*, *N. coeliaca*, *St. rhizophila* установлено образование антимикробных веществ.

5. Создана коллекция из 31 штамма – продуцента антибиотиков, преодолевающих антибиотикорезистентность тест-организмов и для трех штаммов из числа наиболее перспективных изучены антимикробные вещества.

6. Установлено, что эндобионтные штаммы *B. subtilis* INA 01085 и INA 01086, выделенные из одного плодового тела гриба чешуйчатки обыкновенной (*Pholiota squarrosa* (OEDER) P.KUMM, 1871), продуцируют два новых антибиотика пептидной природы и два полиеновых антибиотика.

7. Получен и запатентован штамм *B. pumilus* INA 01110 – продуцент антибиотика амикумацина А. Показана антимикробная активность амикумацина А в отношении *S. aureus* INA 00761 (MRSA), устойчивого к антибиотикам группы ванкомицина, штамма *L. mesenteroides* VKPM В-4177 (VR) и тест-штамма *Myc. smegmatis* mc² 155.

Личный вклад автора

Аналитический обзор научно-методической литературы, посвященной проблематике работы, экспериментальные научные исследования, изложенные в диссертации, и анализ полученных результатов представленной исследовательской работы выполнены автором самостоятельно под руководством д.б.н. профессора Тереховой Ларисы Петровны и к.б.н. Ефременковой Ольги Владимировны.

Апробация работы

Основные положения работы были представлены на конференции студентов и молодых ученых МГУИЭ (Москва, 2011), Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 2012), Международной Конференции «Биотехнология – наука XXI века» (Москва, 2012), Третьем Съезде Микологов России (Национальная Академия Микологии) (Москва, 2012), юбилейной конференции по медицинской микологии (к 100-летию З.Г. Степанищевой) (Москва, 2013), 5-ом Конгрессе Европейских Микробиологов («FEMS 2013») (Лейпциг, Германия, 2013), XIII съезде Общества микробиологов Украины им. С.М. Виноградского (Ялта, 2013), Второй Всероссийской молодежной научной школе-конференции «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» (Оренбург, 2014), Четвертой

международной конференции по науке и прикладным исследованиям «Постгеномные методы анализа в биологии и лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014), VIII Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2015), «ЭкоБиотех 2015» (Уфа, 2015), III международном микологическом форуме (Москва, 2015), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016» (Москва, 2016), Ежегодном Конгрессе с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (ИСМП-2016) (Москва, 2016), научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний» (Москва, 2017), Четвертом Съезде Микологов России (Национальная Академия Микологии) (Москва, 2017), Юбилейной конференции по микологии и микробиологии (Москва, 2018).

Результаты научных изысканий диссертационной работы докладывались на заседаниях Ученого Совета, а также семинарах отдела микробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» (2012 – 2017 гг.).

Публикации

По результатам исследования опубликовано 9 статей в отечественных и зарубежных журналах (6 статей в рецензируемых журналах, 5 из них в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации результатов диссертационных работ, 2 статьи в зарубежных журналах и 1 статья в электронном журнале) и 13 тезисов докладов.

Объем работы

Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка

цитируемой литературы и приложений. Материалы диссертации изложены на 140 страницах машинописного текста, содержат 18 таблиц и 18 рисунков. Список литературы включает 172 источника, в том числе 146 на иностранном языке.

Место проведения работы

Работа выполнена в Секторе поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Отдела микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» и является частью исследования по теме 004: «Изыскание новых антибиотиков, эффективных в отношении резистентных форм патогенных микроорганизмов» (номер госрегистрации 01201281987).

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность за руководство и ценные консультации д.б.н., профессору Л.П. Тереховой, за постоянное внимание, ценные консультации и руководство к.б.н. О.В. Ефременковой, за обучение методам, ценные консультации и помощь в работе к.б.н. И.А. Маланичевой, за помощь в работе и поддержку коллегам В.Ф. Васильевой, И.Г. Сумаруковой, А.А. Глуховой, Ю.В. Бойковой, к.б.н. Н.Д. Малкиной, за сотрудничество в выделении и изучении химической природы антибиотиков д.х.н. В.А. Коршуну, к.х.н. В.А. Зенковой, д.х.н., профессору Г.С. Катрухе, к.х.н. Е.А. Рогожину, д.х.н. А.М. Королеву, а также д.х.н., профессору П.В. Сергиеву, к.х.н. И.А. Остерману (МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ), за предоставление образцов для исследования д.б.н., профессору Г.И. Эль-Регистан (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН).

Особую благодарность автор выражает д.б.н. В.С. Садыковой, д.б.н. Л.Г. Стояновой, д.б.н. О.А. Лапчинской и д.б.н. Э.Р. Переверзевой за постоянное внимание к работе, объективные замечания и ценные консультации, которые позволили улучшить работу.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Диссертационная работа посвящена поиску продуцентов новых антибиотиков, преодолевающих антибиотикорезистентность микроорганизмов. Проблема антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов возрастает до угрожающе высокого уровня во всем мире. Инфекционные заболевания, вызванные патогенами, резистентными к антибиотикам различных классов, не поддаются лечению ни одним из имеющихся в клинике лекарственных средств и часто приводят к летальному исходу. Это делает чрезвычайно актуальным создание и внедрение новых антибактериальных препаратов.

Одним из подходов к решению данной задачи является поиск продуцентов новых природных соединений, обладающих антибиотической активностью. Долгое время основными объектами поиска продуцентов антибиотиков были представители типа *Actinobacteria*, но сейчас наряду с актинобактериями целесообразно исследовать представителей других таксонов бактерий, не столь хорошо изученных в этом отношении. При этом целью поиска являются малоизученные виды или виды, выделенные из ранее неисследованных источников. В связи с этим обзор литературы посвящен проблеме антибиотикорезистентности, основным таксономическим группам организмов – продуцентов антибиотиков и собственно бактериям, как источнику новых антимикробных природных соединений.

1.1. Проблема лекарственной устойчивости патогенных микроорганизмов

С момента открытия А. Флемингом пенициллина в 1928 году началась эра антибиотиков. Однако первые сообщения об устойчивости бактерий к пенициллину появились уже в 1940 году до начала его широкого применения в клинической практике (рисунок 1). По оценке Центра по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)

только в США ежегодно резистентными штаммами инфицируются около 2 млн человек, из которых 23000 умирают².

В 2009 году Американское общество инфекционных болезней [Boucher et al., 2009] выделило семь особо опасных антибиотикорезистентных патогенных бактерий, объединенных в группу ESKAPE (эти микроорганизмы в процессе селекции приобрели свойство ускользать — escape — от действия современных антибиотиков): *Enterococcus faecium* (VRE), *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella* spp. и *Escherichia coli* (с расширенным спектром бета-лактамаз — extended spectrum beta-lactamases (ESBL)), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. В феврале 2017 года было опубликовано сообщение ВОЗ³ уже о двенадцати особо опасных для здоровья человека антибиотикорезистентных бактериях. По степени опасности патогенные микроорганизмы разделены на три группы (критический, высокий и средний уровни опасности) в зависимости от того, насколько быстро необходимо найти антибиотики для лечения вызываемой ими инфекции.

В первую группу вошли бактерии с множественной лекарственной резистентностью, в частности, с устойчивостью к карбапенемам и цефалоспорином третьего поколения: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacteriaceae*. Во вторую группу включены бактерии *Enterococcus faecium* (VR), *Staphylococcus aureus* (MR, VR, VI), *Helicobacter pylori*, устойчивые к фторхинолонам *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. и *Neisseria gonorrhoeae*. К третьей группе отнесены *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Shigella* spp. (таблица 1).

² <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>

³ http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1



Рисунок 1. Временная шкала развития устойчивости к антибиотикам⁴.

Примечание: R (resistant) – резистентность, XDR (extensively drug-resistant) – экстенсивная резистентность, PDR (pan-drug-resistant) – панрезистентность.

⁴ <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>

Таблица 1. Антибиотикорезистентность бактерий, представляющих угрозу для жизни человека [составлена по материалам Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC)⁵, Mégraud, 2013].

Штаммы бактерий	Инфекции, вызванные данными штаммами	Антибиотики, к которым выражена устойчивость
Критический уровень опасности		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Пневмония, сепсис	Все или почти все медицинские антибиотики, включая карбапенемы
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Пневмония, инфекции мочевыводящих путей и крови (при использовании катетеров)	Все или почти все медицинские антибиотики, включая аминогликозиды, цефалоспорины, фторхинолоны и карбапенемы
Штаммы <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Klebsiella</i> spp. и <i>Escherichia coli</i>)	Госпитальные инфекции	Пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы
Высокий уровень опасности		
<i>Enterococcus faecium</i>	Госпитальные инфекции, включая инфекции крови и мочевых путей при хирургических вмешательствах	МЛУ, в том числе к ванкомицину
<i>Staphylococcus aureus</i>	Кожные и раневые инфекции, пневмония	MRSA; VRSA
<i>Helicobacter pylori</i>	Гастрит, язвенная болезнь и аденокарцинома желудка	Кларитромицин и левофлоксацин
<i>Campylobacter</i> spp.	Диарея (часто с кровью), лихорадка, в редких случаях, временный паралич	Азитромицин или ципрофлоксацин
<i>Salmonella</i> spp.	Диарея (иногда с кровью), лихорадка, сепсис	Цефтриаксон и ципрофлоксацин

⁵ <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>

Продолжение таблицы 1.

Штаммы бактерий	Инфекции, вызванные данными штаммами	Антибиотики, к которым выражена устойчивость
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Гонорея, воспаление уретры, шейки матки, прямой кишки	Цефалоспорины, азитромицин, тетрациклин
Средний уровень опасности		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Бактериальная пневмония, менингит, инфекции уха, сепсис	Пенициллин, антибиотики группы эритромицина (амксициллин и азитромицин)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Поражение органов дыхания, центральной нервной системы и развитие гнойных очагов в различных органах	Ампициллин
<i>Shigella</i> spp.	Диарея (иногда с кровью), лихорадка и боли в животе, реактивный артрит	Ампициллин, триметоприм/сульфаметоксазол, ципрофлоксацин (фторхинолон), азитромицин

За последние 30 лет количество антибактериальных средств для системного применения, одобренных Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA – Food and Drug Administration), уменьшилось на 75%. По данным ВОЗ с 2000 по 2015 год в мировую медицинскую практику были введены 30 антибиотиков, одобренных национальными агентствами. Из них новыми природными антибиотиками являются только 2, 12 являются продуктами трансформации природных антибиотиков и 16 соединений синтезированы искусственно. Из 16 синтетических новых антибиотиков, одиннадцать - хинолоны, два - оксазолидиноны, остальные являются единичными примерами нитроимидазола, тиосемикарбазона и диарилхинолина. Из двух природных антибиотиков и 12 полусинтетических шесть относятся к бета-лактамам антибиотикам и три относятся к классу гликопептидов, остальные пять принадлежат к различным другим классам [Butler et al., 2013; Newman et al., 2016; Butler et al., 2017]. В период 2016-2017 года описано только одно антибактериальное лекарственное средство (из группы хинолонов). На рисунке 2 и в таблице 2 представлены антибиотики, введенные в медицинскую практику в период с 2010 по 2017 год⁶ [Butler et al., 2017]. Среди них лишь один препарат разработан в России: перхлозон (тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат) является пероральным лекарственным средством, разработанным АО «Фармасинтез» (Москва, Россия), и одобренным в 2012 году в России для лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью [Gopal, Dick, 2015; Butler et al., 2017].

⁶ <https://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/medical-conditions/B#>



Рисунок 2. Количество антибиотиков, введенных в мировую медицинскую практику в период 2010-2017 гг. [составлена по материалам, опубликованным на сайте CenterWatch⁷ и Butler et al., 2017].

Таблица 2. Антибиотики, введенные в мировую медицинскую практику в период 2010-2017 гг [составлена по материалам, опубликованным на сайте CenterWatch⁸, DrugBank⁹ и Butler et al., 2017].

№	Название АБ	Год	Класс АБ	Происхождение АБ (производитель)	Применение
1.	Цефтаролин	2010	Цефалоспорины	П (гриб)	Бактериальные инфекции кожи и бактериальная пневмония
2.	Фидаксомин	2011	Тиакумицины	П (актинобактерия)	<i>Clostridium difficile</i> -ассоциированная диарея
3.	Бедаквлин	2012	Диарилхинолины	С	Туберкулез

⁷ <https://www.centerwatch.com/>

⁸ <https://www.centerwatch.com/>

⁹ <https://www.drugbank.ca/>

Продолжение таблицы 2.

№	Название АБ	Год	Класс АБ	Происхождение АБ (произцент)	Применение
4.	Перхлозон	2012	Тиосемикарбазоны	С	Туберкулез
5.	Тедизолид	2014	Оксазолидиноны	С	Бактериальные инфекции кожи
6.	Деламанид	2014	Нитроимидазолы	С	Туберкулез
7.	Далбаванцин	2014	Гликопептиды	ПС	Бактериальные инфекции кожи
8.	Оритаванцин	2014	Гликопептиды	ПС	Бактериальные инфекции кожи
9.	Цефтолозан/тазобактам	2014	Цефалоспорины + ингибиторы бета-лактамаз	КП	Внутрибрюшные инфекции и инфекции мочевых путей
10.	Немоноксацин	2014	Хинолоны	С	Внебольничная пневмония, инфекции кожи и мягких тканей
11.	Финафлоксацин	2014	Фторхинолоны	С	Острый внешний отит, вызванный чувствительными штаммами <i>P. aeruginosa</i> и <i>S. aureus</i>
12.	Цефтазидим/авибактам	2015	Цефалоспорины + ингибиторы бета-лактамаз	КП	Внутрибрюшные инфекции и инфекции мочевых путей
13.	Озеноксацин	2015	Хинолоны	С	Бактериальные инфекции кожи
14.	Делафлоксацин	2017	Фторхинолоны	С	Бактериальные инфекции кожи

Примечание: АБ – антибиотик, П – природный, С – синтетический, ПС – полусинтетический, КП – комбинированный препарат.

Сложившийся кризис беспокоит специалистов в области бактериологии, осознающих, что создается катастрофическое положение в области лечения инфекционных заболеваний. С целью предотвращения развития антибиотикорезистентности разрабатываются программы, создаются общества и ассоциации, принимаются декларации и глобальные планы действий¹⁰ [Gilbert et al., 2010]. Существует коалиция из 40 малых и средних биофармацевтических компаний, ориентированных на открытие и разработку новых противомикробных препаратов, альянс Биотехнологов Европы, исследующих антимикробную устойчивость (BEAM – Biotechs from Europe innovating in Anti-Microbial Resistance). Значительное число членов альянса BEAM разрабатывают инновационные соединения с совершенно новыми механизмами действия - лекарства, которые срочно необходимы для борьбы с растущим числом полирезистентных микроорганизмов¹¹.

1.2. Механизмы формирования антибиотикорезистентности

В связи с быстрым распространением антибиотикорезистентности болезнетворных микроорганизмов в настоящее время является актуальным исследование механизмов формирования лекарственной устойчивости. В 2008 году российские ученые из Института молекулярной генетики РАН обнаружили гены устойчивости к антибиотикам, высокоомологичные таковым современных клинических штаммов, у микроорганизмов из природных экосистем, не подвергавшихся антропогенному воздействию. Для этих исследований были использованы образцы «вечной» мерзлоты Арктики и Антарктики возрастом от 20000 до 3 млн лет [Петрова с соавт., 2008; Petrova et al., 2009]. В 2011 году канадские исследователи провели метагеномные анализы древней ДНК из

¹⁰ <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>

¹¹ <http://beam-alliance.eu>

беринговых вечномерзлых отложений возрастом 30000 лет и обнаружили набор генов, кодирующих устойчивость к бета-лактамам, тетрациклиновым и гликопептидным антибиотикам [D'Costa et al., 2011]. Однако, несмотря на то, что такие гены возникли еще в древности, активное применение антибактериальных препаратов в пищевой промышленности, животноводстве в качестве факторов роста, ветеринарии, а также неоправданное назначение антибиотиков в медицине, способствует селекции и распространению микроорганизмов с антибиотикорезистентностью¹² [Егоров, 2004; Bush et al., 2011; Ventola, 2015].

Различают следующие биохимические механизмы резистентности [Дудник, 1999; Сидоренко, Тишков, 2004; Егоров, 2004; Wright, 2005; Mindlin et al., 2006; Страчунский с соавт., 2007]:

- Модификация мишени действия антибиотика. Данный механизм обусловлен возникновением спонтанных генных мутаций в кодирующих генах или наличием (или приобретением у других видов) генов, продукты которых модифицируют молекулу-мишень;
- Ферментативная инактивация антибиотика (в отношении бета-лактамов, аминогликозидов, хлорамфеникола, эритромицина, линкомицина и родственных им соединений);
- Активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс). Основывается на работе специализированного набора белков, образующих трансмембранные помпы и транспортирующих антибиотик из внутриклеточного пространства во внешнюю среду;
- Нарушение проницаемости оболочки микробной клетки путем изменения химического состава, приводящего к снижению проницаемости мембраны для антибиотиков и других химических соединений.

К генетическим механизмам устойчивости [Сидоренко, Тишков, 2004; Read et al., 2014; Ventola, 2015] относят приобретение новых для бактерии генов

¹² <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>

детерминант резистентности путем горизонтального переноса и модификацию генома путем мутаций (аминокислотные замены, делеции, инсерции) в генах, кодирующих мишени действия антибиотика, системы эффлюкса и пориновые каналы.

Кроме этого, другой проблемой является способность некоторых бактериальных видов генерировать популяции персистеров («persister»), состоящие из генетически идентичной субпопуляции, которая переходит в неактивное состояние и, соответственно, устойчива к лекарственным препаратам [Lewis, 2010; Gross, 2013].

В данной диссертационной работе особое внимание уделялось поиску новых антибиотиков, преодолевающих устойчивость микроорганизмов к бета-лактамам и гликопептидным антибиотикам. Мишенями действия бета-лактамов являются ферменты, участвующие в синтезе клеточной стенки бактерий. Штаммы *S. aureus*, устойчивые к метициллину (MRSA), содержат ген резистентности, обуславливающий изменение пенициллинсвязывающего белка. Механизм действия гликопептидов, в частности ванкомицина, заключается в необратимом связывании молекулы антибиотика с концевыми аминокислотами в боковой пептидной цепочке, и, таким образом, в нарушении последней стадии синтеза пептидогликана. Штамм *L. mesenteroides* обладает природной устойчивостью к гликопептидам, и поэтому был выбран в качестве тест-организма для поиска антибиотиков. Необходимо заметить, что устойчивость к одному антибиотику может обуславливаться разными или одновременно несколькими механизмами. Некоторые клинические штаммы бактерий, устойчивые к бета-лактамам антибиотикам, содержат гены, кодирующие белки инактивации антибиотика и пенициллинсвязывающие белки с измененной структурой [Davies, 1994, Mindlin et al., 2006].

Таким образом, одной из важнейших проблем современного здравоохранения является преодоление антибиотикорезистентности бактерий.

Частью решения этой проблемы является введение в медицинскую практику новых природных антибиотиков, которые преодолевают существующие механизмы устойчивости. Одним из методических подходов к решению этой проблемы является изыскание продуцентов антибиотиков среди штаммов малоисследованных видов, а также штаммов, выделенных из ранее неисследованных в этом отношении природных источников.

1.3. Продуценты антибиотиков разных таксономических групп

За 80-летний период существования науки об антибиотиках неоднократно менялись основные направления исследований в области изыскания новых природных антибиотиков. С 1960-х годов на протяжении 30 лет основными продуцентами антибиотиков были актинобактерии. В настоящее время эта группа микроорганизмов хорошо изучена, поэтому ведется активный поиск не только среди актинобактерий, но также среди бактерий других таксономических групп (называемых в данной работе «бактерии»), грибов, беспозвоночных, растений и представителей других групп организмов [Bérdu, 2005]. При этом целью поиска являются виды, мало изученные или не изученные в качестве продуцентов антибиотиков, а также представители широко распространенных видов, выделенные из различных неисследованных природных источников. К ним относятся редкие виды, виды из необычных биоценозов, например, микроорганизмы-симбионты морских растений и животных, а также организмы, которые ранее не удавалось культивировать в искусственных условиях, например, некоторые виды высших грибов [Chin et al., 2006; Bibi et al., 2016].

На рисунке 3 представлена динамика изучения продуцентов антибиотиков, относящихся к разным таксономическим группам в период с 1950-2000 года [Bérdu, 2005]. К 1970 году было выделено примерно 60% антибиотиков из актинобактерий, преимущественно рода *Streptomyces*. К 1980 г. увеличилась доля

антибиотиков, продуцируемых «редкими родами» актинобактерий. Начиная с 1980 г. возрос интерес к грибам, как продуцентам вторичных метаболитов. В настоящее время основной поиск новых антибиотиков ведется среди бактерий и грибов. По данным литературы перспективными продуцентами антибиотиков являются цианобактерии и миксобактерии [Donadio et al., 2010; Singh et al., 2011]. Среди грибов исследуют базидиомицеты, аскомицеты, в том числе грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*.

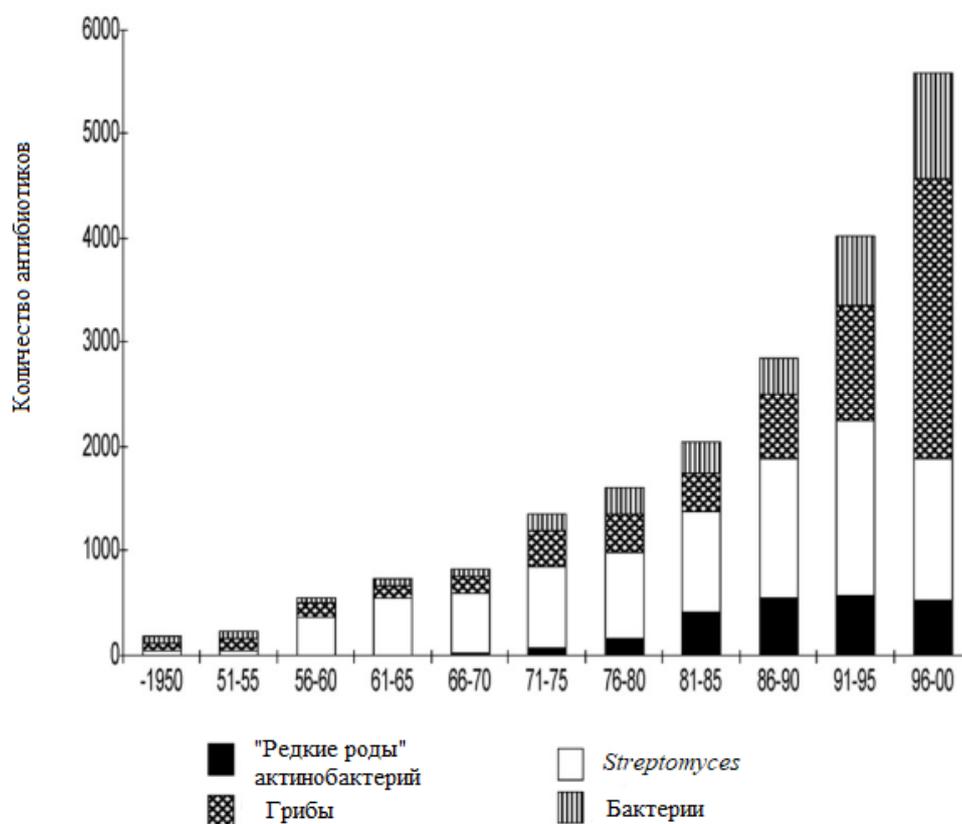


Рисунок 3. Общее количество обнаруженных антибиотиков, образуемых представителями различных таксономических групп (1950-2000 гг.) [Bérdu, 2005].

Практически во всех таксономических группах организмов обнаружены продуценты антибиотиков и других биологически активных вторичных метаболитов. В таблице 3 представлены суммарные данные по количеству

антибиотиков, образованных представителями разных таксономических групп [Bérdy, 2012].

Таблица 3. Приблизительное количество антибиотиков, полученных из различных источников (включая соединения, обладающие противовирусной и противоопухолевой активностью) [Bérdy, 2012].

Источник антибиотиков	Количество антибиотиков
Актинобактерии	10000
Грибы	10000
Бактерии	5000
Растения	15000
Животные	5000

В таблице 4 представлены примеры антибиотиков медицинского назначения, образуемых представителями основных таксономических групп организмов.

Таблица 4. Примеры антибиотиков медицинского назначения, образуемых представителями основных таксономических групп организмов [Егоров, 2004; Singh, Pelaez, 2008].

Группы антибиотиков	Название антибиотика	Механизм действия	Продуценты
Аминогликозиды	Гентамицин	Ингибирование синтеза белка бактерий	<i>Micromonospora purpurea</i>
	Канамицин		<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
	Неомицин		<i>Str. fradiae</i> , <i>Str. albogriseolus</i>
	Стрептомицин		<i>Str. griseus</i>

Продолжение таблицы 4.

Группы антибиотиков	Название антибиотика	Механизм действия	Продуценты
Антрацик-лины	Блеомицин	Ингибирование синтеза нуклеиновых кислот	<i>Str. verticillus</i>
	Даунорубицин		<i>Streptomyces</i> spp.
	Доксорубицин		<i>Str. peucetius</i>
Бета-лактамы	Карбапенемы	Ингибирование синтеза клеточной стенки бактерий	<i>Str. cattleya, Str. olivaceus</i>
	Пенициллины		<i>Penicillium</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.
	Цефалоспорины		<i>Acremonium</i> spp. <i>Emericellopsis</i> spp. <i>Amycolatopsis lactamdurans</i> <i>Str. clavuligerus</i>
Линкозамиды	Линкомицин	Ингибирование синтеза белка бактерий	<i>Str. lincolnensis</i>
Макролиды	Эритромицин	Ингибирование синтеза белка бактерий	<i>Saccharopolyspora erythrae</i>
Пептиды	Бацитрацин	Ингибирование синтеза клеточной стенки бактерий	<i>Bacillus subtilis</i>
	Грамицидин С		<i>B. brevis</i>
	Полимиксины (В, колистин)		<i>B. polymyxa</i>
	Стрептококцин А		<i>Streptococcus pyogenes</i>
Тетрацикли-ны	Тетрациклин	Ингибирование синтеза белка бактерий	<i>Streptomyces</i> spp., <i>Dactosporangium</i> spp., <i>Actinomadura brunnea</i>
Другие	Мупирицин	Ингибирование синтеза белка бактерий	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Различные микроскопические водоросли, включая динофитовые и диатомовые водоросли (представители родов *Chlorophyta*, *Rhodophyta*, *Phaeophyta*, *Ciliophora* и других), являются продуцентами около 1300 биологически активных метаболитов, половина из которых – антибиотики. Лишайники и мхи также образуют порядка 200 антибиотиков. Высшие растения

способны образовывать структурно уникальные вторичные метаболиты, проявляющие противомикробную и/или противоопухолевую активность. Описано около 15000 биологически активных соединений, которые, кроме антибиотиков, включают в себя алкалоиды, флавоноиды, терпеноиды и другие вещества [Bérdy, 2005; Bérdy, 2012].

Высшие растения издавна использовались для лечения заболеваний человека. Например, такие виды, как солодка (*Glycyrrhiza glabra*), мирра (*Commiphora myrrha*), мак (*Papaver somniferum*), масла кедра (*Cedrus* sp.) и кипариса (*Cupressus sempervirens*), и в настоящее время используются для лечения кашля, простуды и в качестве компонентов офтальмологических препаратов. За последние двадцать лет был получен ряд противоопухолевых соединений из числа вторичных метаболитов высших растений (камптотецин, паклитаксел, эпиподофиллотоксин, винбластин, гомогаррингтонин, протопанаксадиол), многие из которых успешно прошли клинические испытания и вошли в клиническую практику [Chin et al., 2006; Cragg, Newman, 2013].

На основе соединений, выделенных из листьев различных видов тиса (*Taxus* sp.), был создан противоопухолевый препарат растительного происхождения паклитаксел («Таксол»), одобренный для клинического применения в лечении рака яичников в 1992 году и рака молочной железы в 1994 году. Благодаря успеху паклитаксела начались обширные исследования по синтезу аналогов, первым был создан близкий по химической структуре препарат доцетаксел («Таксотер»), одобренный в 1998 году для лечения метастатического рака молочной железы. В 2012 году были утверждены для клинического применения композиция из частиц паклитаксела, связанных с белком, известная под торговым названием Абраксан, и третий таксановый кабазитаксел («Джевтана») [Kingston, 2012; Cragg, Newman, 2013].

Последние десять лет активный поиск продуцентов антимикробных веществ ведется среди представителей Царства Животных. В частности, в качестве

продуцентов изучаются морские беспозвоночные, принадлежащие к типам *Porifera*, *Mollusca*, *Cnidaria*, *Echinodermata* и *Bryozoa* (губки, моллюски, стрекающие, иглокожие, мшанки и другие). В настоящий момент известно около 6000 биологически активных соединений. Только губки образуют около 2000 антибиотиков. Кроме этого, активные антимикробные вещества были выделены из насекомых, червей, амфибий и различных позвоночных. Соединений, обладающих антибиотической активностью, выделенных из простейших, известно мало, так же, как и из ракообразных, паукообразных, рыб и птиц [Bérdy, 2005; Bérdy, 2012].

Среди первых биологически активных соединений, полученных из морских беспозвоночных, были спонгоуридин и спонготимидин, выделенные из губки (*Cryptotheca crypta*) в начале 1950-х годов. Через 15 лет они были одобрены как противоопухолевое (цитозин-арабинозид, Ara-C) и противовирусное (аденин-арабинозид, Ara-A) средства, соответственно [Chin et al., 2006]. В 1992 году из катрановой акулы (*Squalus acanthius*) был выделен водорастворимый аминостероид скваламин – вещество, проявляющее сильное противомикробное действие. Позднее было установлено, что оно также обладает активностью в отношении перевиваемых опухолей мышей [Егоров, 2004; Chin et al., 2006; Stonik, 2009]. Некоторые соединения обладают антимикробной активностью, например, рост бактерии *Myc. tuberculosis* ингибирует псевдоптероксазол, бензоксазольный дитерпеновый алкалоид из горгонарии *Pseudopterogorgia elisabethae*. В отношении золотистого стафилококка *S. aureus* проявляет активность димерный изохинолиновый алкалоид джорумицин из тихоокеанского голожаберного моллюска *Jorunna funebris*. Сильным противогрибковым действием обладают алкалоиды фаскаплизин, макролид форбоксазол А и другие, однако они оказались слишком токсичными [Stonik, 2009]. Из позвоночных и беспозвоночных выделен ряд пептидов (пептиды насекомых, магаинины, дефензины, протегрины),

обладающих активностью в отношении бактерий, грибов и вирусов, перспективных для терапевтического использования [Bulet et al., 2004].

Примечательно, что вещества, образуемые макроорганизмами, часто схожи с соединениями, выделенными из их микроорганизмов-симбионтов [Cragg, Newman, 2013]. На данный момент уже присутствуют убедительные доказательства того, что соединения, ранее приписываемые морским беспозвоночным, фактически синтезируются бактериальными симбионтами [Piel, 2004; Singh, Pelaez, 2008; Blunt et al., 2016]. Изначально было показано, что доластатин был выделен из голожаберного моллюска (*Dolabella auricularia*), позже было доказано, что данное соединение продуцируется цианобактериями [Singh, Pelaez, 2008]. В настоящее время производное доластатина (соблидотин) проходит клинические испытания в Японии, Европе и США в качестве противоопухолевого средства для лечения некоторых типов солидных опухолей, в том числе резистентных к другим препаратам [Stonik, 2009]. С помощью метагеномного анализа была обнаружена кассета генов, ответственная за биосинтез каликулина А у *Candidatus Entotheonella* sp., первоначально выделенного из губки *Discodermia calyx* [Blunt et al., 2016].

Некоторые низкомолекулярные соединения (простые ароматические соединения, гетероциклы, алкалоиды, флавоноиды) микроорганизмов аналогичны веществам, выделенным из высших растений, что также не исключает их симбиотического происхождения. Исследования в этой области проводятся в настоящее время [Bérdu, 2005].

Однако наиболее частыми и универсальными продуцентами являются актинобактерии, грибы и бактерии. Несмотря на снижение интереса к актинобактериям, как источнику антимикробных веществ, преобладающая часть известных в настоящее время антибиотиков микробного происхождения была выделена из них (около 10000 антибиотических соединений) [Bérdu, 2005; Bérdu, 2012]. При этом около 90% из них выделены только из представителей рода

Streptomyces, остальные – из культур родов актинобактерий, которые условно принято считать редкими (*Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Streptosporangium*, *Saccharopolyspora*) [Bérdy, 2005; Ventura et al., 2007; Baltz, 2008]. Вышеперечисленные «редкие роды» актинобактерий образуют разнообразные, уникальные, иногда очень сложные соединения, демонстрирующие высокую антибиотическую активность и низкую токсичность.

Небольшое количество выделяемых штаммов «редких родов» актинобактерий (на настоящий момент описано около 100 видов) рода *Streptomyces* можно объяснить тем, что их сложно выделять из окружающей среды и поддерживать жизнеспособность [Bérdy, 2005]. Однако, благодаря разработке новых методов число таких таксонов актинобактерий возрастает [Терехова с соавт., 1990; Donadio et al., 2002; Bérdy, 2005].

Все известные гликопептидные антибиотики образуются почти исключительно «редкими видами» актинобактерий. Макролиды, полиеновые антибиотики, аминогликозиды, антрациклины (каждая группа охватывает около 400-500 соединений) выделены исключительно из актинобактерий. Другие небольшие группы соединений, такие как полиэфирные антибиотики (около 250 соединений); новобиоцин и родственные антибиотики, актиномицины, эхиномицин-подобные хиноксалиновые пептиды (каждая группа охватывает около 100 соединений) также исключительно продукты актинобактерий. Преобладающая часть макроциклических производных лактона (более 1000 соединений), производные бензантрахинона (около 200), тетрациклины (около 40) получены также из различных видов актинобактерий [Bérdy, 2005; Bérdy, 2012].

Из различных видов рода *Streptomyces* выделено большое количество важных химиотерапевтических агентов, противоопухолевых антибиотиков, к которым относятся антрациклины, блеомицин, митомицин, энедины и стауроспорины. В настоящее время в онкологии используют даунорубицин,

доксорубицин, идарубицин и эпирубицин; гликопептидные антибиотики блеомицины А2 и В2 («Бленоксан»); митозаны (митомицин С). На протяжении десяти лет в клинической практике использовали конъюгат калихеамицина (энедин), связанный с моноклональным антителом («Милотарг»), для монотерапии острого миелоидного лейкоза. Однако в 2010 году препарат был изъят из продажи, а в сентябре 2017 года FDA было опубликовано сообщение о повторном одобрении препарата с понижением дозы¹³ [Cragg, Newman, 2013]. Несмотря на то, что интерес к изучению актинобактерий как продуцентов снизился, их нельзя недооценивать. Актинобактерии еще долгое время будут перспективными источниками новых соединений. В 2003 году для лечения инфекций кожи FDA был одобрен антибиотик даптомицин («Кубицин»). Соединение было получено из *Str. roseosporus*, и представляет собой циклический липопептид. Биапенем, выделенный из *Str. cattleya*, является аналогом карбапенема и активен в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, включая виды – продуценты бета-лактамаз. Эртапенем, карбапенем, также выделенный из *Str. cattleya*, обладает антибактериальной активностью широкого спектра действия, в частности в отношении клинически значимых микроорганизмов *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Morganella morganii*, *Proteus* sp. и *Serratia marcescens* [Chin et al., 2006]. В 2006 году проводилось исследование генома штамма-продуцента ванкомицина *Amycolatopsis orientalis* ATCC 43491, которое прогнозировало наличие кластера биосинтетических генов около десяти вторичных метаболитов. Было выделено соединение ЕСО-0501, подтвержденное спектральными анализами, и, соответствующее предсказанным геномным анализам. ЕСО-0501 показало высокую антибактериальную активность в отношении устойчивого к метициллину золотистого стафилококка *S. aureus* (MRSA) и энтерококков, устойчивых к ванкомицину (VRE) [Banskota et al., 2006; Cragg, Newman, 2013].

¹³ <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm574507.htm>

Обширный поиск продуцентов новых антибиотиков ведется среди морских и эндофитных актинобактерий. Исследования образцов глубоководных осадков привели к открытию нового класса антибиотиков абиссомицинов – полициклических антибиотиков, выделенных из морской актинобактерии рода *Verrucosispora*. Абиссомицин С и его стереоизомер проявляют антибиотическую активность в отношении грамположительных бактерий, включая *S. aureus* с множественной лекарственной устойчивостью [Donadio et al., 2010]. Моллемицин А первый в своем классе гликоль-гексадепсипептид-поликетид, выделенный из *Streptomyces* sp. (глубоководные осадки, Австралия), обладает антибактериальной и чрезвычайно сильной противомаларийной активностью в отношении чувствительного и устойчивого к лекарственным средствам *Plasmodium falciparum* [Blunt et al., 2016]. В 2002 году, благодаря подбору условий культивирования и филогенетическому анализу, был описан первый морской род актинобактерий *Salinospora*, который впоследствии был переименован в *Salinispora*. В 2003 году данный род бактерий был описан в качестве продуцентов мощного цитотоксина салиноспорамида А [Mincer et al., 2002; Feling et al., 2003; Cragg, Newman, 2013]. В настоящее время завершена первая стадия клинических испытаний салиноспорамида А («Маризомиб»), разрабатываемого для лечения множественной миеломы. В 2006 году были выделены новые макролиды мариномицины, проявляющие активность в отношении устойчивых бактериальных патогенов и опухолевых клеток [Cragg, Newman, 2013].

По количеству образуемых антибиотиков грибы занимают одно из первых мест (около 5000 антибиотических соединений). Наиболее часто встречающимися продуцентами являются грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium* [Pela'ez, Genilloud, 2003]. Помимо них несколько других аскомицетных грибов *Trichoderma*, *Phoma*, *Alternaria*, *Acremonium* и *Stachybotrys* также являются продуцентами нескольких сотен биологически активных веществ. Около 1000 антимикробных соединений было получено из высших грибов, как мицелиальных (например, из

базидиомицетов *Ganoderma*, *Lactarius* или *Aureobasidium*), так и дрожжевых (около 100 соединений) [Bérdu, 2005]. Вторичные метаболиты грибов чаще всего обладают противогрибковой (полиены, азолы, эхинокандины, сордарины), антибактериальной (пенициллины, цефалоспорины) и противоопухолевой (иллудины, фумагиллин, ризоксин) активностью, но также оказывают противопаразитарное (фумагиллин, апицидин), иммуносупрессорное (циклоспорины) и гиполипидемическое (статины) действие [Pela'ez, 2004; Chin et al., 2006; Cragg, Newman, 2013]. Только грибы продуцируют пептаиболы – антибиотические пептиды, активные в отношении грамположительных микроорганизмов и паразитов, некоторые из них также обладают противоопухолевой активностью [Shi et al., 2010; Bérdu, 2012].

В 2005 году FDA утвердили для клинического использования микафунгин («Микамин») – противогрибковое соединение группы эхинокандина, полученное из аскомицетного гриба *Coleophoma empetri*. Микафунгин проявил высокую противогрибковую активность против широкого диапазона грибов, включая *Candida* и *Aspergillus* [Chin et al., 2006]. Цефдиторен пивоксил («Спектрацеф») в 2001 году был одобрен для лечения обострений бактериального хронического бронхита и неосложненных инфекций кожи и мягких тканей в США. Цефдиторен – пероральный цефалоспорин III поколения, выделенный из *Cephalosporium* sp., только недавно был одобрен в РФ для терапии острого риносинусита, стрептококкового фарингита/тонзиллита, инфекционного обострения хронической обструктивной болезни лёгких, внебольничной пневмонии, а также инфекций кожи и мягких тканей у взрослых и детей старше 12 лет. Цефдиторен обладает высокой активностью в отношении широкого спектра аэробных возбудителей внебольничных инфекций, включая *Strep. pneumoniae*, *Strep. pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus* и многих представителей семейства *Enterobacteriaceae* [Chin et al., 2006; Козлов, Дехнич, 2014].

В последнее время большой интерес в изучении продуцентов антибиотиков вызывают эндофитные грибы [Gunatilaka, 2006; Verma et al., 2009]. Из гриба *Fusarium* sp., эндофита дуба (*Quercus variabilis*), выделен гликофинголипидный цереброзид – фузарурид, обладающий антибактериальной активностью. Фомол, новый поликетидный лактон, проявляющий антибактериальное, противогрибковое и противовоспалительное действие, выделен из *Phomopsis* sp. – эндофита аргентинского лекарственного растения эритрина (*Erythrina crista-galli*). Ранее известный макролидный грибковый метаболит, брефелдин А с широким спектром биологической активности, был выделен из *Aspergillus clavatus* и *Paecilomyces* sp. – эндофитов *Taxus mairei* и *Torreya grandis* в Китае. Новый антибиотик, лактон S 39163/F-I, обладающий противомикробным и противовирусным действием, был выделен из *Microsphaeropsis* sp., эндофитного грибкового штамма, встречающегося в листовой ткани самшита вечнозеленого (*Buxus sempervirens*) [Gunatilaka, 2006].

Из гриба-симбионта морской губки (*Rhabdormia* sp.) *Aspergillus similanensis* выделено два изокумариновых производных, хевалон С и хевалон Е. Соединение хевалон Е не проявляло антибактериальной активности, но при использовании в совокупности с оксациллином и ампилицином обладало синергетическим эффектом [Blunt et al., 2016].

Среди бактерий наиболее часто встречающимися продуцентами являются представители таких родов, как *Bacillus* (около 800 соединений) и *Pseudomonas* (около 600 соединений), затем следуют энтеро- и лактобациллы и стрептококки. Бактерии обычно продуцируют пептиды, простые гетероциклы (феназины) и алифатические соединения (производные жирных кислот) [Bérdu, 2005]. Один из наиболее актуальных и используемых в медицине вторичных метаболитов мупироцин выделен из *P. fluorescens* (таблица 4). Полимиксин и бацитрацин, пептидные антибиотики, выделенные из бацилл, используются в медицине в настоящее время [Singh, Pelaez, 2008; Fickers, 2012].

В период с 2010 по 2015 года было идентифицировано 12 новых антибактериальных соединений, продуцируемых морскими бациллами, и 3 новых соединения, образуемых морскими грамотрицательными бактериями. Из образца морских отложений (риф Гагео, Корея) был выделен штамм *B. subtilis*, который продуцировал три новых линейных липоди- и липотетрапептида, названные гагеотетрины А-С. Соединения обладали активностью в отношении *S. aureus* и *B. subtilis* (МПК $\leq 0,02$ мкг/мл). Гагеотетрины В и С также показали хорошую активность на *Salmonella typhi* (МПК 0,01 мкг/мл) и *P. aeruginosa* (МПК $\leq 0,03$ мкг/мл). Из другого штамма *B. subtilis* были выделены три новые макролактина – гагеомакролактины 1-3. Гагеомакролактин 1 проявлял наиболее высокую активность по сравнению с его двумя аналогами, и обладал ингибирующим действием в отношении грамположительных *S. aureus*, *B. subtilis* и *B. cereus* и грамотрицательных *E. coli*, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa* бактерий с МПК в диапазоне 0,01-0,02 мкг/мл. Из горгонового коралла Южно-Китайского моря (*Gorgonaria*) был выделен штамм *B. amyloliquefaciens*, который образовывал новый 24-членный кольцевой лактон, макролактин V и его эписмер макролактин S, ингибирующие рост *S. aureus* и *E. coli* (МПК 0,1 мкг/мл и МПК $\leq 0,3$ мкг/мл для двух соединений, соответственно). Тест-штамм *B. subtilis* был чувствителен к макролактину V (МПК 0,1 мкг/мл), но нечувствителен к макролактину S (МПК 100 мкг/мл). Из штамма *B. licheniformis*, выделенного из морской мидии, был получен белок, проявляющий антимикробную активность в отношении *P. aeruginosa* и *B. pumilus* (МПК 3,1 мкг/мл) и эффективно ингибирующий образование биопленки. Из мягкого коралла (Красное море, Акаба, Иордания) был выделен штамм *Vibrio* sp., который образовывал семь ранее неизвестных производных малеимида: акабамицины А-Д, смесь акабамицинов Е и Е', и акабамицины F и G. Анализ антимикробной активности акабамицинов Е, Е' и F показал наивысшую активность в отношении *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*

и *Proteus vulgaris* с МПК в интервале 3-25 мкг/мл. МПК акабамицинов А-D варьировала от 25 до 100 мкг/мл [Schinke et al., 2017].

В последние десятилетия все больше появляется данных, что природные соединения, выделенные из растений и животных, могут являться продуктами метаболизма ассоциированных с ними микроорганизмов [Cragg, Newman, 2013; Challinor, Vode, 2015]. В начале 1980х годов из гриба, принадлежащего к роду *Rhizopus*, был выделен ризоксин, обладающий противоопухолевым действием. В 2005 году была опубликована статья об обнаружении внутриклеточной бактерии *Burkholderia rhizoxinica*, которая фактически являлась продуцентом ризоксина [Partida-Martinez, Hertweck, 2005; Crawford, Clardy, 2011].

Грамотрицательные бактерии родов *Xenorhabdus* или *Photorhabdus* являются симбионтами нематод *Steinernema* и *Heterohabditis*, соответственно. С начала 1980х годов было идентифицировано большое количество соединений, например, ксенорабдины, ксеноксиды, ксенокумацины, нематофины, производные стильбена, производные антрахинона. Ряд этих соединений проявляют антибактериальную (в том числе против MRSA) и противогрибковую активность, что имеет большое значение для их применения в медицине и сельском хозяйстве [Катруха с соавт., 2009; Challinor, Vode, 2015; Tyurin et al., 2017].

Представители родов *Burkholderia* и *Janthinobacterium* (отряд Burkholderiales) – патогенные бактерии, представляющие угрозу здоровью людей, но кроме этого они являются потенциальным источником новых активных соединений. *Burkholderia* spp. образует антибактериальные полиены энацилоксины. Соединение энацилоксин Па обладает активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, в частности подавляет рост штаммов с множественной лекарственной устойчивостью *Burkholderia multivorans* и *Acinetobacter baumannii*. Представителей рода *Janthinobacterium* можно обнаружить в самых разнообразных местах обитания, например, они

являются симбионтами насекомых и земноводных. *J. lividum* образует антибактериальное соединение янтиноцин А, которое демонстрирует активность *in vitro*, сравнимую с активностью ванкомицина. Ягарицин, циклический липопептид, продуцируемый грибным патогеном *J. agaricidamnosum*, обладает противогрибковой активностью против патогена человека *Candida albicans*, а также *Aspergillus fumigatus* и *A. terreus* [Challinor, Bode, 2015].

Из бактериального штамма *Serratia marcescens*, являющегося эндофитом водного растения *Rhyncholacis penicillata*, был выделен ооцидин А. Данное соединение рассматривается в качестве агента агрохимического контроля оомицетных грибов, включая такие рода как *Pythium* и *Phytophthora* [Verma et al., 2009].

Исследования последних лет показали, что некоторые виды родов *Cyanobacter* и *Mycobacter* продуцируют химически разнообразные соединения [Bérdu, 2005]. По данным литературы описано около 600 соединений из цианобактерий, обладающих антибактериальной, цитотоксической, антипротозойной и противовирусной активностью [Bérdu, 2005; Singh, Pelaez, 2008; Singh et al., 2011]. Цианобактерии производят вторичные метаболиты следующей химической природы: липопептиды (40,2%), амиды (9,4%), аминокислоты (5,6%), жирные кислоты (4,2%), макролиды (4,2%), и др. [Singh et al., 2011]. К сожалению, небольшое количество антибактериальных соединений из цианобактерий охарактеризовано структурно. Некоторые из них: носкомин 57, выделенный из *Nostoc commune*, активен в отношении *B. cereus*, *S. epidermidis*, *E. coli*; соединение, выделенное из *Anabaena*, действует на ванкомицин-резистентный *S. aureus* (с МПК 32-64 мкг/мл); парациклофаны, выделенные из *Nostoc* sp., обладают антибактериальной активностью в отношении золотистого стафилококка; амбигуин-І изонитрил, выделенный из *Fischerella* sp., показал более высокую активность, чем стрептомицин в отношении *B. subtilis* и *Staphylococcus albus*; из *Micrococcus lacustris* выделены два новых норбетана,

обладающие активностью в отношении *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli* и *K. pneumoniae*. [Singh et al., 2011]. Из цианобактерии *Prochloron didemni*, симбионта морского беспозвоночного асцидия (*Lissoclinum patella*), были выделены циклические пептиды (пателламид С, улиптиациламид, пателлин 6 или транкаламид А), обладающие противоопухолевой активностью [Schmidt et al., 2005; Crawford, Clardy, 2011].

Известно около 400 биологически активных соединений, выделенных из *Mycobacteria* (класс Deltaproteobacteria, тип Proteobacteria), обладающих противогрибковой, антибактериальной и противоопухолевой активностью [Dawid, 2000; Bérdu, 2005]. Миксобактерии образуют соединения, принадлежащие к таким классам, как поликетиды, линейные и циклические пептиды, гетероциклические соединения и др. [Dawid, 2000; Charousová et al., 2017]. Примечательно, что у миксобактерий описаны механизмы действия антибиотиков, которые очень редки для соединений, образуемых другими организмами: ингибиторы транспорта электронов; ингибиторы полимераз нуклеиновой кислоты; ингибитор грибковой ацетил-СоА-карбоксилазы; вещества, действующие на цитоскелет [Reichenbach, 2001]. Миксобактерии (*Sorangium cellulosum*, *Sorangium* sp.) образуют эпотилоны (и их производные), соединения перспективные в лечении рака [Chin et al., 2006; Singh, Pelaez, 2008; Cragg, Newman, 2013; Li et al., 2014; Challinor, Bode, 2015].

Таким образом, из литературных источников следует, что новые антибиотики могут быть выделены из представителей разных таксономических групп. Один и тот же вид способен продуцировать несколько антибиотиков, поэтому целесообразным представляется исследовать различные экологические источники. При этом из малоисследованных источников выше вероятность выделения потенциальных продуцентов новых антибиотиков.

1.4. Бактерии как источник антибиотиков

Длительный период основной исследуемой группой организмов при изыскании новых антибиотиков были актинобактерии. По сравнению с ними бактерии других таксонов на настоящий момент менее изучены как продуценты антибиотиков, хотя среди них известны продуценты ценных антибиотиков, используемых в медицине (граммицидин С, полимиксины и бацитрацины), пищевой промышленности для консервации и предотвращения порчи мясных, рыбных и молочных продуктов (субтилины, низины) или используемых в качестве добавок к корму домашних животных в сельском хозяйстве.

Среди бактерий широко распространена способность вырабатывать антимикробные пептиды. Бактериальные антимикробные пептиды (АМП), синтезируемые на рибосоме, называются бактериоцинами. Они демонстрируют высокую специфичность относительно мишени, проявляя активность в отношении родственных бактерий, хотя многие имеют более широкий спектр действия [Abriouel et al., 2011; Cui et al., 2012; Nishie et al., 2012; Perez et al., 2014].

Существует несколько подходов в классификации бактериоцинов. Один из них используют для классификации бактериоцинов молочнокислых бактерий [Orpegård et al., 2007; Стоянова с соавт., 2012; Nishie et al., 2012; Montalbán-López et al., 2012; Cotter et al., 2013; Perez et al., 2014]:

- Класс I, лантибиотики, пептиды с молекулярной массой менее 5 кДа, которые подвергаются посттрансляционной модификации. Подразделяются на тип А – линейные пептиды (низин) и тип В – глобулярные пептиды (актагардин и цинамицин);
- Класс II – немодифицируемые пептиды (или подверженные незначительной модификации, например, формированию дисульфидных мостиков, зацикливанию и др.), с молекулярной массой менее 10 кДа, термостабильные. Класс II делится на 4 подкласса:

IIa – термостабильные пептиды, имеющие специфическую консервативную N-концевую последовательность Тир-Гли-Асп-Гли-Вал-Хак-Цис, содержащие от 37 (лейкоцин А и мезентерицин Y105) до 48 аминокислот (карнобактериоцин В2 и энтероцин SE-K4). Отличаются высокой активностью по отношению к патогенным бактериям рода *Listeria*;

IIb – дипептидные бактериоцины, имеющие в лидерном пептиде двойной глициновый мотив (лактококцин G, плантарицин E/F, лактацин F, термофилин 13);

IIc – циклические бактериоцины с ковалентно замкнутым C- и N-концами (лактоциклицин Q и лейкоциклицин Q);

IId – другие бактериоцины класса II (лактицин Q и Z, вейсселицин Y и M, лейкоцин Q и N).

- Класс III включает крупные бактериоцины, с молекулярной массой более 30 кДа, неантибиотиковые, термолабильные белки (гельветицин J и лактацин B).

- Класс IV составляют сложные бактериоцины, содержащие как белковые, так и липидные или углеводные компоненты. Сведения по структуре и функциях малочислены (лейконоцин S, лактоцин, мезентерицин 52).

Низин, образуемый *Lactococcus lactis*, впервые был описан Роджерсом в 1928 году. Данное соединение представляет собой единственный антибиотик, одобренный FDA в качестве пищевого консерванта в США. Низин обладает широким спектром действия в отношении грамположительных бактерий, включая *S. aureus*, *Strep. pyogenes*, *Clostridium botulinum* и *Listeria monocytogenes*, и грамотрицательных бактерий *Neisseria* spp., *Klebsiella* spp., *Aeromonas* spp., *E. coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* и *P. fluorescens* [Rogers, 1928; Ageitos et al., 2017]. Антибиотики типа B, в

особенности мерсацидин и актагардин, обладают активностью в отношении грамположительных микроорганизмов, включая важные резистентные патогены, такие как MRSA, VRE (энтерококки, резистентные к ванкомицину) и *Clostridium difficile*. В ветеринарии используется пробиотик на основе *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*, действие которого, вероятно, связано с выработкой бифицина, подавляющего рост микроорганизмов таких родов, как *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* и вид *Alicyclobacillus acidoterrestris* [Egan et al., 2016].

Другие грамположительные бактерии также способны синтезировать бактериоцины, например, представители родов *Clostridium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Sarcina* [Егоров, Баранова, 1999; Rea et al., 2011; Daly et al., 2012; Yang et al., 2014; Egan et al., 2016]. Примеры представлены в таблице 5. Стрептококки также образуют бактериоцины, наиболее широко распространены лантибиотики саливарцины А и его варианты. Продуцентами являются *Strep. salivarius*, *Strep. pyogenes*, *Strep. dysgalactiae* и *Strep. agalactiae*. Примечательно, что единственным местом обитания *Strep. salivarius* является ротовая полость и верхние дыхательные пути человека. Изучение способности *Strep. salivarius* образовывать бактериоциноподобные соединения показало, что целесообразно рассматривать его применение в качестве пробиотика [Wescombe et al., 2010].

Аналогичным образом можно классифицировать рибосомно синтезированные антимикробные пептиды, образуемые грамотрицательными бактериями, на небольшие пептиды такие, как микроцины и более крупные белки – колицины. Микроцины далее подразделяются на основании присутствия (класс I) или отсутствия (класс II) существенных модификаций [Severinov et al., 2011; Cotter et al., 2013]. Примеры представлены в таблице 6.

Микроцин J25 (MccJ25) относится к микроцинам класса I, синтезируется *E. coli*, и способен ингибировать рост ряда грамотрицательных бактерий семейства

Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Salmonella* sp. и *Shigella* sp.) в наномолярных концентрациях (например, *E. coli* AB1133, МПК 0,009 мкМ; *Salmonella enterica* serotype Newport, МПК 0,005 мкМ) [Ageitos et al., 2017]. Микроцин В17 (MccB17) и микроцин С7-С51 (MccC7-С51) также относятся к классу I, пептидам, подвергающимся посттрансляционной модификации. Класс II включает пептиды с молекулярной массой в диапазоне от 5 до 10 кДа и подразделяется на два подкласса: микроцины класса IIa содержат дисульфидные связи (MccL, MccV, и Mcc24), а микроцины класса IIb представляют собой линейные пептиды (MccE492, MccM, MccH47 и MccI47) и соответствуют семейству сидерофоров-микроцинов [Duquesne et al., 2007; Morin et al., 2011].

Таблица 5. Примеры бактериоцинов, образуемых грамположительными бактериями [Егоров, Баранова, 1999; Rea et al., 2011; Daly et al., 2012; Yang et al., 2014; Egan et al., 2016].

Продуцент	Название
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Бифидоцин
<i>Bifidobacterium</i> subsp. <i>animalis</i>	Бифицин
<i>Brevibacterium linens</i>	Липоцин
<i>Enterococcus durans</i>	Дураницин
<i>Enterococcus faecalis</i>	Энтероцины
<i>Enterococcus faecium</i>	Энтерококцин, энтероцины
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Ацидоцин
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Амиловорин
<i>Lactobacillus bavaricus</i>	Баварицин
<i>Lactobacillus brevis</i>	Бревицин
<i>Lactobacillus casei</i>	Казеицин
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Курвацин
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Ацидоцины, гассерицин
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Пентоцин
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Плантарицин, плантацин
<i>Lactobacillus sake</i>	Лактоцин, сакацин
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Бактериоцин*
<i>Lactococcus cremoris</i> subsp. <i>cremoris</i>	Лактококцин
<i>Lactococcus garvieae</i>	Гарвицин

Продолжение таблицы 6.

<i>Lactococcus lactis</i>	Вариацин, диацетин, лактицины, лактококцин, низин, саливаримицин
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Лейкоциклицин, мезентерицин
<i>Micrococcus</i> sp.	Микрококцин
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Бактериоцин*, педиоцин
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Педиоцин
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Стафилококцин, эпидермин, эпиланцин, эпицидин
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Галлидермин
<i>Streptococcus macedonicus</i>	Мацедоцин, мацедовицин
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Стрептококцин, стрептин
<i>Streptococcus salivarius</i>	Саливарцин
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Бактериоцин*, термофилин
<i>Weissella hellenica</i>	Вейсселлицин

Примечание: * нет названия.

Таблица 6. Примеры бактериоцинов, образуемых грамотрицательными бактериями [Егоров, Баранова, 1999; Masschelein et al., 2017].

Продуцент	Название
<i>Escherichia coli</i>	Колицины, микроцины
<i>Haloferax gibbonsii</i>	Галоцин
<i>Klebsiella</i> spp.	Клебоцины
<i>Neisseria</i> spp.	Бактериоцин*
<i>Pseudomonas</i> spp.	Пиоцины
<i>Pantoea agglomerans</i>	Пантоцин
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Бактериоцин*
<i>Serratia marcescens</i>	Бактериоцин*
<i>Vibrio cholerae</i>	Вибриоцин
<i>Yersinia pestis</i>	Пестицин

Примечание: * нет названия.

Классификация бактериоцинов, образуемых представителями рода *Bacillus*, несколько отличается. На основании химической структуры и биологической активности, бактериоцины, образуемые бациллами, могут быть разделены на три основные группы (таблица 7). Класс I бактериоцинов, лантибиотики,

представляют пептиды, которые подвергаются посттрансляционной модификации. Данный класс можно подразделить на четыре подкласса. Подклассы I.1-I.3 включают пептиды с модификациями типичными для лантибиотиков (например, образование лантионина (Lan) и метиллантионина (MeLan)), тогда как подкласс I.4 включает другие уникальные модификации. К подклассу I.1 относится тип А лантибиотиков с линейной структурой (субтилины и эрицины). Субтилин, продуцируемый *B. subtilis* ATCC 6633, является моделью лантибиотика синтезируемого представителями рода *Bacillus*. Данное соединение представляет собой катионный пентациклический антимикробный пептид, близкий по структуре к низину, который синтезируется *Lactococcus lactis*, эпидермину и рер5, продуцентом которых является *S. epidermidis*, и к эрицинам штамма *B. subtilis* A 1/3 (рисунок 4). В подкласс I.2 входит тип В лантибиотиков, имеющих глобулярную структуру, примерами являются мерсацидин, субланцин 168 и панибациллин. Подкласс I.3 включает двухкомпонентные лантибиотики такие, как галодурацин и лихеницидин. К подклассу I.4 относят уникальный пептид субтилозин А, представляющий циклическую молекулу из 35 аминокислот с уникальной посттрансляционной структурой, которая включает три поперечные связи между атомами серы цистеина и альфа-углеродами двух фенилаланинов и одного треонина (S-C-связи). Бактериоцины класса II включают небольшие (0,77-10 кДа) рибосомно синтезированные немодифицированные пептиды. В класс III входят большие белки с молекулярной массой выше 30 кДа, представителями являются мегацины А-216 и А-19213, синтезируемые штаммами *B. megaterium* [Abriouel et al., 2011; Fickers, 2012; Barbosa et al., 2015; Sumi et al., 2015].

Мерсацидин, тетрациклический пептид с молекулярной массой 1,8 кДа, образуется представителями рода *Bacillus*, и обладает активностью в отношении метициллинрезистентного *S. aureus* и ванкомицинрезистентных штаммов

Enterococci, сопоставимой с активностью ванкомицина и тейкопланина [Chatterjee et al., 1992; Baruzzi et al., 2011; Sumi et al., 2015].

Таблица 7. Классификация бактериоцинов *Bacillus* spp. [Abriouel et al., 2011; Fickers, 2012; Barbosa et al., 2015; Sumi et al., 2015].

Классификация бактериоцинов		Примеры	Молекулярная масса (кДа)	Продуцент
Класс I:	подкласс I.1	субтилин	3,34	<i>B. subtilis</i>
		эрицин S	3,44	
		эрицин A	2,98	
	подкласс I.2	мерсацидин	1,82	<i>B. subtilis</i>
		субланцин 168	3,88	
		панибациллин	2,98	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	подкласс I.3	лихеницидин (α , β)	3,25 и 3,02	<i>B. licheniformis</i>
		галодурацин (A1, A2)	3,04 и 2,33	<i>B. halodurans</i>
подкласс I.4	субтилозин (A, A1)	3,39 и 3,41	<i>B. subtilis</i>	
Класс II		цереин (7A, 7B, MRX1)	3,94; 4,89; 3,14	<i>B. cereus</i>
		турицин (439, 17, H, S)	2,92 и 2,80; 3,16; 3,14; 3,14	<i>B. thuringiensis</i>
		бактурицин F4	3,16	
		лихенин	1,4	<i>B. licheniformis</i>
		коагулин	4,6	<i>B. coagulans</i>
Класс III		мегацины (A-216, A-19213)	32,85; 21,02 и 39	<i>B. megaterium</i>

Следует заметить, что бактериоцины, образуемые *Bacillus* spp., демонстрируют более широкий антимикробный спектр, чем большинство бактериоцинов молочнокислых бактерий [Wang et al., 2014; Sumi et al., 2015].

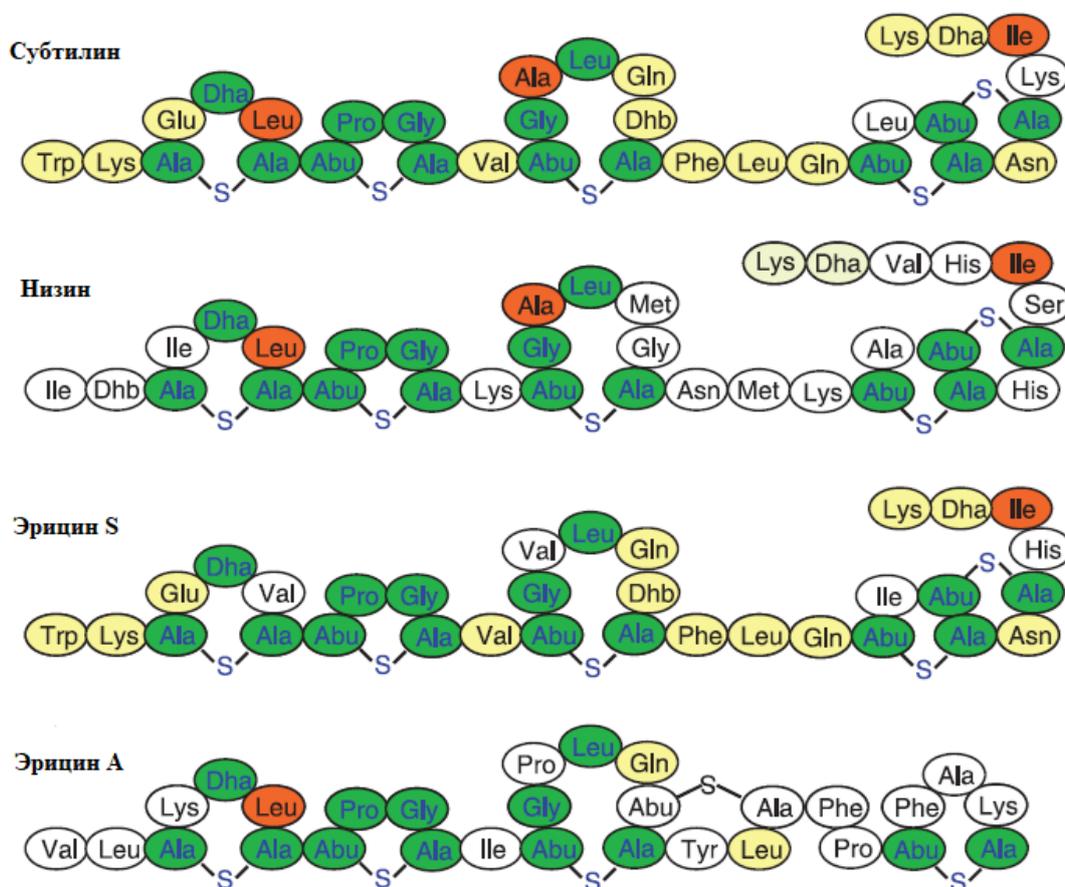


Рисунок 4. Сравнение структур субтилина, низина и эрицинов S и A [Abriouel et al., 2011]. Примечание: зеленым цветом помечены аминокислотные остатки в одинаковых положениях для всех четырех бактериоцинов.

Помимо бактериоцинов бактерии способны образовывать нерибосомные пептиды, которые содержат огромное количество структурных особенностей, отличающие их от рибосомно синтезированных пептидов. Например, они содержат непротеиногенные аминокислоты, такие как орнитин в тироцидине A, фенгицине и грамицидине C (рисунок 5). Кроме того, структуры в основном макроциклические (тироцидин A), разветвленные макроциклические (фенгицин) или представляют собой димеры двух (грамицидин C) или полимеры трех (энтеробактин, бациллибактин) одинаковых структур. Также структурной особенностью нерибосомных пептидов является наличие малых

гетероциклических соединений (тиазол в эпотилоне), ацетата или пропионата или жирных кислот (сурфактин) [Schwarzer et al., 2003; Gulick, 2017]. Структуры некоторых нерибосомных пептидов представлены на рисунке 6.

Такое разнообразие структур обуславливает их широкий диапазон биологической активности: антибиотической (тироцидин А, грамицидин С, бацитрацин), иммуносупрессивной, цитостатической (эпотилоны). Некоторые соединения участвуют в хелатировании железа и таким образом относятся к сидерофорам (бациллибактин, энтеробактин) [Schwarzer et al., 2003; Fickers, 2012].

Тиротрицин – первый пептидный антибиотик, используемый в медицине, представляет собой смесь циклических (тироцидины 70-80%) и линейных (грамицидин D 20-25%) пептидов, продуцируемых *B. brevis* [Dubos, 1939; Ageitos et al., 2017]. Эти антимикробные пептиды (АМП) обладают активностью в отношении грамположительных, кроме *Bacillus* spp., и некоторых грамотрицательных бактерий, например, *Neisseria* sp. Гагетотетрины (А-С) представляют собой короткие линейные липопептиды, продуцируемые морским изолятом *B. subtilis*, и активные в отношении *S. aureus*, *B. subtilis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium и *P. aeruginosa*. Полимиксин В – циклический АМП, продуцируемый *Paenibacillus polymyxa*, активен в отношении широкого спектра грамотрицательных бактерий. Полимиксин Е (колистин) представляет собой циклический АМП, образуемый *Paen. polymyxa* var. *colistinus*. Колистин применяется в медицине в Европе и Японии начиная с 1950-х годов. Колистин активен в отношении грамотрицательных бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*), и является антибиотиком резерва [Ageitos et al., 2017]. Однако в 2014 году Европейский центр профилактики и контроля заболеваний (ECDC) сообщил, что 5% изолятов *K. pneumoniae* оказались устойчивы к

колистину¹⁴. Бацитрацин, образуемый *B. subtilis* и *B. licheniformis*, обнаружен в 1943 году. Механизмом действия является ингибирование синтеза бактериального пептидогликанового слоя [Sumi et al., 2015; Ageitos et al., 2017]. Бацитрацин используется до настоящего времени для лечения стафилококковой пневмонии у новорожденных, так как обладает низкой токсичностью [Fickers, 2012].

Противогрибковые липопептиды, такие как итурин, бацилломицин и фенгицин, имеют молекулярную массу от 1028 до 1084 Да и синтезируются несколькими штаммами *B. subtilis* [Sumi et al., 2015].

У представителей рода *Bacillus*, кроме этого, была обнаружена способность синтезировать необычные пептидные антибиотики, такие как ризоктицины, фосфонатные олигопептидные антибиотики, содержащие С-концевую небелковую аминокислоту (Z)-1-2-амино-5-фосфоно-3-пентеновую кислоту (APPA). Ризоктицин А известен как ингибитор роста дрожжей и нитчатых грибов, но он неактивен в отношении бактерий.

¹⁴ <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/press/Press%20Releases/EAAD-2014-antimicrobial-resistance-resistance-to-last-line-antibiotics.pdf>

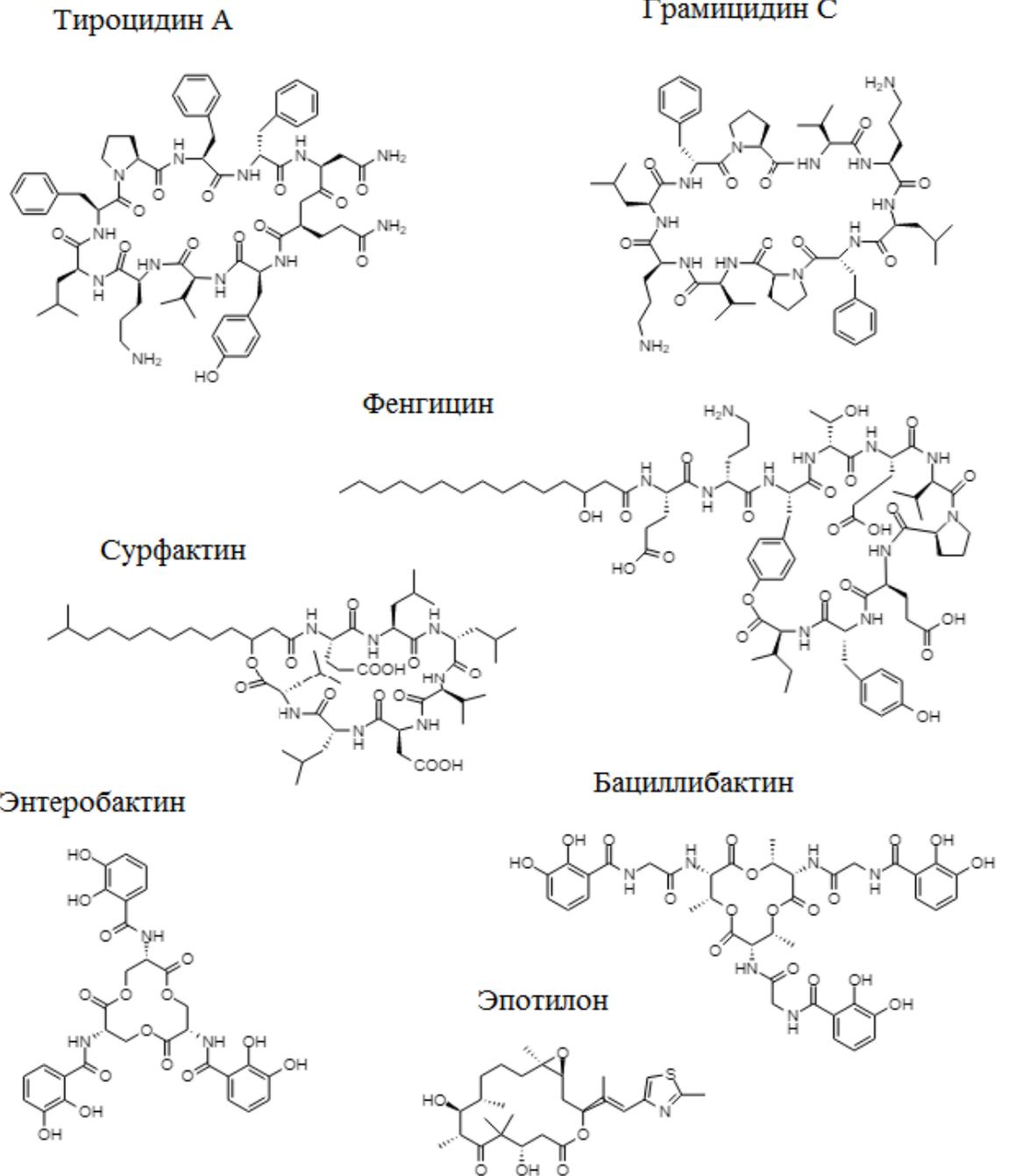


Рисунок 5. Примеры структур нерибосомных пептидов, образуемых бактериями [Schwarzer et al., 2003].

Кроме антимикробных соединений, основанных на АРРА, некоторые штаммы *B. subtilis* продуцируют дипептидный бацилизин, состоящий из L-аланина и L-антикапсина. Антикапсин ингибирует синтез глюкозамина, вызывая, таким образом, сбой в синтезе клеточной стенки бактерий и, в конечном счете, в росте бактерий [Fickers, 2012].

Помимо антимикробных пептидов бактерии способны синтезировать непептидные соединения, такие как поликетиды, аминсахара и фосфолипиды. Механически синтетазы нерибосомных пептидов (NRPSs) тесно связаны с поликетидсинтетазами (PKSs), так как их молекулы синтезируются большими мультимодульными синтетазами путем наращивания активированных мономеров аминокислот и гидроксильных кислот [Finking, Marahiel, 2004; Stein, 2005; Fickers, 2012]. Благодаря изменчивому механизму синтеза, поликетиды проявляют удивительное разнообразие структур и биологической активности. Так, были обнаружены три кластера функциональных генов, управляющих синтезом диффицидина, макролактинина и бациллина в *B. amyloliquefaciens*. Диффицидин является ненасыщенным 22-членным макроциклическим полиенлактонфосфатэфиром с широким спектром антибактериальной активности. Он подавляет биосинтез белка и оказался перспективным в использовании против *Erwinia amylovora*, патогена растений, вызывающего гниль яблок и груш. Макролактин, состоящий из 24-членного лактонного кольца, ингибирует рост клеток мышиной модели меланомы, вируса герпеса у млекопитающих и эффективен в защите лимфобластных клеток от ВИЧ. Аналогично диффицидину, бациллин является ингибитором синтеза белка у прокариот, и проявляет антимикробную активность по отношению к патогенам человека, таким как *Serratia marcescens*, *K. pneumonia* и *S. aureus* [Fickers, 2012]. Амикумацины синтезируются несколькими видами *Bacillus*. Их антибактериальная и противовоспалительная активность, а также их действие на *Helicobacter pylori* делают амикумацины привлекательными для лечения хронического гастрита и язвенной болезни [Stein, 2005].

Поликети́ды грамотрицательных бактерий, такие как амбрутицины и еранголиды представляют собой структурно связанные поликети́ды, которые проявляют сильную противогрибковую активность и продуцируются различными штаммами *Sorangium cellulosum*. Амбрутицины показали минимальные побочные эффекты при лечении кокцидиомикоза и гистоплазмоза у мышей, что делает их перспективными противогрибковыми лекарственными средствами [Masschelein et al., 2017].

Недавно появилось сообщение об открытии гладиолина - нового соединения с низкой токсичностью. Оно синтезируется клиническим изолятом *Burkholderia gladioli* BCC0238 и перспективно для использования против *Myc. tuberculosis*, так как обладает активностью в отношении устойчивых к изониазиду и изониазиду/рифампицину клинических изолятов (МПК 0,4 мкг/мл в отношении штамма H37Rv) [Song et al., 2017; Masschelein et al., 2017].

Мупи́роцин представляет собой комплекс поликетидного антибиотика, первоначально выделенного из *P. fluorescens*. Псевдомонические кислоты А, В, С и D используются локально для лечения инфекций, вызванных грамположительными бактериями, включая метициллинрезистентный *S. aureus* (MRSA). Элансолиды представляют собой необычную группу поликетидов с антимикробной и цитотоксической активностью, первоначально выделенных из бактерии *Chitinophaga sancti*, ранее известной как *Flexibacter* sp. Элансолиды А проявляют выраженную активность в отношении грамположительных бактерий и фибробласты мышей [Masschelein et al., 2017].

Ряд соединений, выделенных из бактерий, синтезируются гибридами синтетаз NRPS и PKS. Это метаболиты, состоящие из поликетидной основы с участием включенных аминокислот в случае гибрида PKS-NRPS или пептидной цепи, содержащую группу кетонов характерных для гибрида NRPS-PKS. Среди них есть три липопептида группы итурина, а именно микосубтилин, итурин А и бациломицин D, продуцируемые различными штаммами *Bacillus*. Итурины представляют собой амфифильные циклические пептиды, состоящие из семи α -аминокислот, связанных с одной β -амино жирной кислотой. Микосубтилин,

продуцируемый *B. subtilis* ATCC6633, оказался очень эффективным против патогена человека дрожжей *Candida albicans* и как агент биоконтроля для предотвращения заражений у саженцев томатов фитопатогеном *Pythium* [Fickers, 2012].

Ряд грамотрицательных бактерий (*P. fluorescens*, *Vibrio coralliilyticus*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, а также несколько видов *Serratia*) способен синтезировать андримид, соединение, обладающее широким спектром действия и рассматриваемое в качестве перспективного кандидата для дальнейшего изучения в качестве антибактериального препарата. Зеимины представляют собой необычный класс полиаминсодержащих гибридных поликетид-нерибосомных пептидных метаболитов *Serratia plymuthica* RVH1. Помимо токсичности для широкого спектра про- и эукариотических организмов, таких как бактерии, грибы, оомицеты, растения и нематоды, некоторые зеамины также обладают антипролиферативной активностью в отношении опухолевых клеток человека [Masschelein et al., 2017].

Удивительные биологические свойства различных типов соединений, образуемых бактериями, могут помочь в решении проблемы антибиотикорезистентности. Необходимо заметить, что среди бацилл вид *B. subtilis* занимает первое место по числу описанных антибиотиков различной химической природы, среди которых есть поликетидные антибиотики, фосфолипиды, полиены, макролактинны и различные пептиды, различающиеся по химической структуре, механизму биосинтеза и антимикробным спектрам действия [Fickers, 2012]. На сегодняшний день известна только малая доля антимикробных молекул, продуцируемых бактериями. Таким образом, дальнейшее изыскание новых антимикробных соединений бактериального происхождения возможно, и является актуальным и перспективным.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Поиск продуцентов антибиотиков проводили среди 329 штаммов бактерий, выделенных из различных природных источников:

204 штамма бактерий выделены из образца выщелоченного чернозема Краснодарского края, полученного из Коллекции почв ФГБНУ «НИИНА»;

93 штамма бактерий выделены из плодовых тел базидиальных грибов, собранных в Москве и Московской области;

32 штамма бактерий, выделенные из многолетнемерзлой почвы Антарктики, были переданы нам профессором Г.И. Эль-Регистан из Института микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН (Москва). Исследуемые штаммы выделены из природных образцов многолетнемерзлых пород Антарктики, представляющих отложения морской террасы о. Кинг-Джордж (ст. Беллинсгаузен), сильно промытых флювиогляциальными водами. Возраст исследуемых отложений составляет 7,5 тыс. лет. Образцы были получены из скважины глубиной 9 м. На рисунке 6 представлена карта с географическим местоположением отбора образцов.

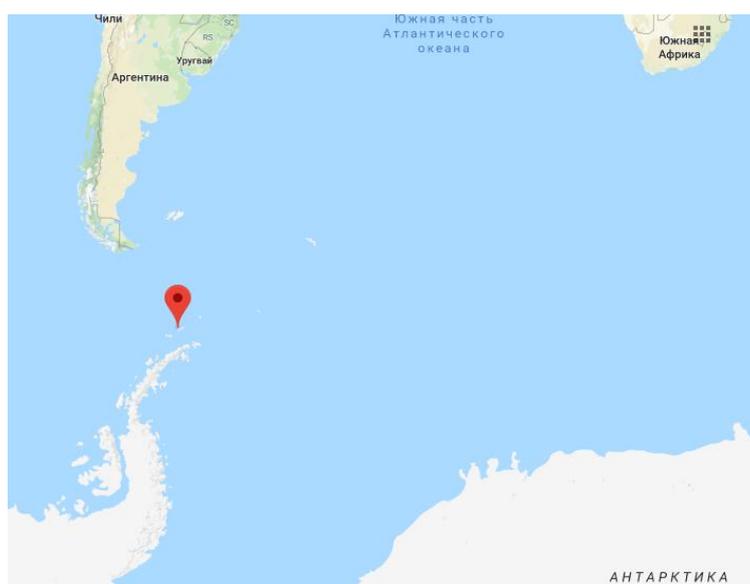


Рисунок 6. Географическое положение отбора образцов многолетнемерзлых пород Антарктики (станция Беллинсгаузен).

2.2. Питательные среды и условия культивирования

Для поверхностного культивирования использовали следующие среды (%) (Гаузе с соавт., 1983):

- (1) минеральный агар №1 Гаузе (синтетическая среда): крахмал – 2,0, NaCl – 0,05, K₂HPO₄ – 0,05, MgSO₄ – 0,05, FeSO₄ – 0,001, агар – 2,0, вода водопроводная; pH 7,2-7,4.
- (2) модифицированная агаровая среда №2 Гаузе: глюкоза – 1,0, пептон – 0,5, триптон – 0,3, NaCl – 0,5, агар – 2,0, вода водопроводная; pH 7,2-7,4.
- (3) овсяный агар: овсяная мука – 2,0, агар – 2,0, вода водопроводная; pH 7,2.
- (4) агаризованная среда M2: солодовый экстракт (Maltax, Финляндия) – 2,0, агар – 2,0, вода водопроводная; pH 6,8.

Для глубинного культивирования использовали среды (%):

- (1) модифицированная среда №2 Гаузе: глюкоза – 1,0, пептон – 0,5, триптон – 0,3, NaCl – 0,5, вода водопроводная; pH 7,2-7,4.
- (2) модифицированная среда №2 Гаузе с мелом: глюкоза – 1,0, пептон – 0,5, триптон – 0,3, NaCl – 0,5, мел – 0,25, вода водопроводная; pH 7,2-7,4.
- (3) среда M2: солодовый экстракт (Maltax, Финляндия) – 2,0, вода водопроводная; pH 6,8.

Стерилизацию питательных сред проводили автоклавированием в течение 1 часа при избыточном давлении 1 атм.

Штаммы бактерий инкубировали при 37°C; актинобактерии, грибные тест-культуры и бактериальный тест-штамм *L. mesenteroides* VKPM В-4177 – при температуре 28°C. Длительность поверхностного культивирования составляла 1-12 суток в зависимости от объекта.

Глубинное культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, объем среды составлял 100 и 150 мл. Нагрузка посевного материала бактерий составляла 10⁶-10⁷ клеток/мл. Для аэрирования колбы помещали на

качалку со скоростью вращения 220 об/мин и инкубировали при температуре 28°C. Длительность инкубирования составляла до 7 суток. Антибиотическую активность бактериальных штаммов определяли на 2, 4 и 7 сутки. При определении антибиотической активности на первом этапе использовали модифицированную среду №2 Гаузе, объем среды в колбе 150 мл.

Образование антибиотиков штаммами INA 01085 и INA 01086 исследовали в условиях глубинного культивирования, проводившегося в две стадии. Для этого в колбы с культуральной средой вносили посевной материал в виде кусочка агаровой среды с поверхностным ростом бактерий. Через двое суток роста в полученных культурах с помощью микроскопии определяли титр клеток в камере Горяева и полученную посевную культуру вносили в колбы со свежей средой в количестве 10^5 клеток/мл среды. При последующем культивировании на протяжении 9 суток ежедневно отбирали пробы культуральной жидкости для анализа антибиотической активности.

Образование антибиотиков штаммом INA 01087 исследовали в глубинных условиях. Для этого в колбы засеивали суспензию спор в количестве 10^7 спор/колбу. При последующем культивировании на протяжении 9 суток ежедневно отбирали пробы культуральной жидкости для анализа антибиотической активности.

2.3. Выделение бактерий из природной среды

2.3.1. Выделение бактерий из почвы

В работе использовали образец выщелоченного чернозема из Краснодарского края. Навеску почвы растирали в ступке, затем добавляли воду, полученную водную суспензию почвы тщательно перемешивали на шейкере, фильтровали через стерильный ватный фильтр, делали серию разведений и высевали на агаровую среду. Отдельные колонии отсеивали в пробирки на скошенную агаровую среду №2 Гаузе и инкубировали несколько суток.

2.3.2. Выделение бактерий из плодовых тел базидиальных грибов

Плодовые тела грибов без признаков лизиса собирали в Москве и Московской области в летний период 2011-2014 годов. Не позднее чем через 2 часа после сбора грибов в пробирки на агаровую среду переносили кусочек ткани плодового тела. Для этого участок плодового тела гриба протирали спиртовым тампоном и надсекали раскаленным скальпелем. По месту надреза плодовое тело разламывали, и кусочек ткани из толщи плодового тела переносили скальпелем или бактериологической петлей на поверхность агаровой среды №2 Гаузе в чашку Петри (рисунок 7). Посевы инкубировали при комнатной температуре от 2 до 18 суток. Затем в лабораторных условиях при наличии бактерий осуществляли их рассев, определяли однородность на основании морфологических признаков и отсевали бактериальные изоляты в пробирки на скошенную агаровую среду для дальнейшей работы.

В исследовании бактерии были выделены из 86 плодовых тел грибов. Видовую принадлежность грибов определяли на основании морфологических признаков плодовых тел, описывавшихся при сборе. Для идентификации выделенных видов использовали ряд определителей [Nilsson, Persson, 1978a; Nilsson, Persson, 1978b; Дудка, Вассер, 1987; Бондарцева, 1998; Гарибова, Сидорова, 1999; Грюнерт, Грюнерт, 2002; Лессо, 2003; Index Fungorum Address¹⁵].

¹⁵URL: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>



Рисунок 7. Выделение грибов в культуру тканевым методом.

2.4. Тест-штаммы для определения антибиотической активности

В качестве тест-объектов для определения антимикробной активности исследуемых штаммов-продуцентов и для определения МПК использовали следующие коллекционные штаммы микроорганизмов:

Грамположительные бактерии:

Bacillus subtilis ATCC 6633 (=RIA 445);

B. mycooides 537;

B. pumilus NCTC 8241;

Leuconostoc mesenteroides VKPM B-4177;

Micrococcus luteus NCTC 8340;

Mycobacterium smegmatis VKPM Ac 1339;

Мyc. smegmatis mc² 155;

Staphylococcus aureus FDA 209P (MSSA);

S. aureus INA 00761 (MRSA);

Грамотрицательные бактерии:

Escherichia coli ATCC 25922;

Comamonas terrigena VKPM B-7571 (=ATCC 8461);

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853;

Грибы:

Aspergillus niger INA 00760;

Saccharomyces cerevisiae RIA 259.

2.5. Определение антибиотической активности

Антибиотическую активность определяли методом диффузии в агар. Для этого в чашки диаметром 9 см разливали по 15 мл расплавленной агаровой среды №2 Гаузе. На застывшую поверхность среды высевали газоном тест-культуру из расчета 10^7 клеток на см².

Использовали два варианта метода:

- Метод лунок: В лунки диаметром 9 мм закапывали по 0,1 мл культуральной жидкости исследуемых штаммов (рисунок 8).
- Метод дисков: Выделенные вещества или фракции веществ наносили на диски фильтровальной бумаги диаметром 6 мм. Диски подсушивали, а затем помещали на поверхность агаровой среды (рисунок 9).

После инкубирования в термостате при температуре 28°C и 37°C в течение суток определяли антибиотическую активность по наличию зон задержки роста тест-организмов.

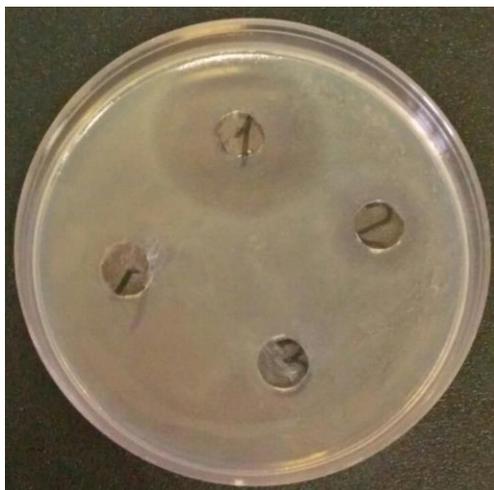


Рисунок 8. Определение антибиотической активности методом лунок.



Рисунок 9. Определение антибиотической активности методом дисков.

2.6. Микроскопирование

Образцы микроскопировали с помощью светового микроскопа Olympus BX41TF (Япония). Просмотр препаратов осуществляли при увеличении в 100, 200, 400 и 1000 раз.

Исследовали живые культуры и фиксированные препараты. Для приготовления фиксированных препаратов каплю культуральной жидкости или взятый бактериологической петлей материал с агаровой среды и помещенный в каплю воды равномерно распределяли по предметному стеклу, подсушивали на воздухе и затем фиксировали в растворе Карнуа: этиловый спирт 96%:хлороформ:ледяная уксусная кислота; 6:3:1. Время фиксации 5 минут, затем препарат промывали 70% этиловым спиртом и подсушивали на воздухе.

Для определения принадлежности к грамположительным или грамотрицательным бактериям фиксированные препараты бактерий окрашивали по Граму, для чего использовали следующие растворы:

Раствор генцианвиолета: генцианвиолет – 0,2 г, спирт – 2 мл, фенол – 0,4 г, вода – 20 мл.

Раствор Люголя: в 2 мл воды растворяли 0,4 г KI и 0,2 г I₂ после чего добавляли 60 мл воды.

Карболовый фуксин: фуксин основной – 0,1 г, спирт – 1 мл, фенол – 0,5 г, вода – 10 мл. Для окрашивания использовали раствор, разведенный 1:10.

Фиксированные мазки окрашивали раствором генцианвиолета в течение 1 минуты, затем краситель фиксировали раствором Люголя, промывали спиртом и в течение 30 секунд дополнительно окрашивали в растворе карболового фуксина, после чего препарат промывали водой и подсушивали на воздухе. Грамположительные микроорганизмы окрашиваются в синий или темно-фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в красный.

В качестве контролей использовали штаммы грамположительной бактерии *B. subtilis* ATCC 6633 и грамотрицательной бактерии *E. coli* ATCC 25922.

2.7. Видовая идентификация штаммов-продуцентов на основании анализа последовательности гена 16S рРНК

2.7.1. Выделение геномной ДНК из бактериальных клеток с использованием набора PowerSoil DNA Kit

Набор реактивов PowerSoil DNA Kit (MO BIO, США, номер в каталоге 12888-100) применяли для выделения геномной ДНК из бактерий, грибов и водорослей, выделенных из природных источников. Реактивы предназначены для предварительной обработки биологического образца (растворы Bead Solution и C1), лизиса клеток и удаления органических и неорганических остатков клеток при сохранении ДНК (C2, C3), сорбции ДНК при очистке (C4), промывке (C5) и элюции (C6).

Для выделения геномной ДНК в пробирку Bead Solution объемом 2 мл, содержащую лизирующий буфер (SDS) и стеклянные шарики, вносили образец биомассы в количестве 100-300 мкг. В качестве биомассы использовали поверхностные культуры бактерий и грибов, а также погруженные культуры актинобактерий. Пробирки с образцами встряхивали на шейкере-вортексе (Microspin FV-2400, BIOSAN) в течение 3-5 минут, добавляли 60 мкл раствора C1 и дополнительно встряхивали на шейкере-вортексе в течение 10 минут на максимальной скорости, после чего центрифугировали в течение 30 секунд при скорости 12200 об/мин (центрифуга Minispin, Eppendorf, радиус ротора 60 мм) при комнатной температуре.

Супернатант переносили в чистую микроцентрифужную пробирку, добавляли 250 мкл раствора C2 и встряхивали на шейкере-вортексе в течение 5 секунд. Инкубировали 5 минут при 4°C, после чего центрифугировали 1 минуту при 12200 об/мин. Супернатант полностью переносили в чистую микроцентрифужную пробирку, не касаясь осадка, добавляли 200 мкл раствора C3 и встряхивали на шейкере-вортексе в течение нескольких секунд.

Инкубировали 5 минут при 4°C, после чего центрифугировали 1 минуту при 12200 об/мин.

Весь супернатант, не касаясь осадка, переносили в чистую микроцентрифужную пробирку, добавляли 1,2 мл раствора С4 и встряхивали на шейкере-вортексе в течение 5 секунд. Затем частями супернатант переносили на колонку с фильтром и центрифугировали 1 минуту при 12200 об/мин. Добавляли 500 мкл раствора С5 и центрифугировали в течение 30 секунд при 12200 об/мин.

Колонку с фильтром переносили в чистую микроцентрифужную пробирку, после чего в центр белой мембраны фильтра добавляли 100 мкл раствора С6, инкубировали 3 минуты и центрифугировали при 12200 об/мин в течение 30 секунд. Колонку выбрасывали, а пробирку с выделенной ДНК хранили при -20°C.

2.7.2. Выделение геномной ДНК из бактериальных клеток с использованием набора BioSilica

В набор реактивов для выделения геномной ДНК из бактериальных клеток (BioSilica, номер в каталоге GBD100) входят буфер 1, буфер 2, пробирки с лизоцимом, протеиназой К и РНКазой А, раствор для сорбции, растворы для промывки 1 и 2. Для элюции ДНК с колонок использовали воду (nuclease-free, ThermoScientific, номер в каталоге AM9916).

В микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл вносили 100 мкл буфера 1 и образец биомассы в количестве 100-300 мкг, добавляли 20 мкл лизоцима и 4 мкл РНКазы А. Суспензию тщательно перемешивали на шейкере-вортексе и инкубировали при 37°C в течение 20 минут. После чего центрифугировали в течение 5 минут при 13000 об/мин, фильтрат удаляли. Осадок ресуспензировали в 180 мкл буфера 2 и добавляли 2 мкл протеиназы К. Пробирки с образцами тщательно перемешивали на шейкере-вортексе и инкубировали при 60°C в течение 20 минут, периодически перемешивая. Добавляли 400 мкл раствора для сорбции, перемешивали и инкубировали при 60°C в течение 10 минут. Полученный раствор наносили на колонку, предварительно помещенную в

пробирку объемом 2 мл. Центрифугировали 1 минуту при 13000 об/мин и фильтрат удаляли. В центр мембраны наносили 400 мкл раствора для промывки 1 и центрифугировали 1 минуту при 13000 об/мин, фильтрат удаляли. После чего на фильтр наносили 600 мкл раствора для промывки 2 и центрифугировали 1 минуту при 13000 об/мин. Фильтрат удаляли, дополнительно центрифугировали 1 минуту при 13000 об/мин. Микроколонку с фильтром извлекали и перемещали в новую пробирку объемом 1,5 мл. На фильтр наносили 100 мкл воды и инкубировали в течение 3 минут при комнатной температуре, центрифугировали 1 минуту при 13000 об/мин. Микроколонку с фильтром удаляли, а раствор с выделенным образцом ДНК переносили в новую пробирку. Полученные образцы хранили при -20°C не более 1 месяца.

2.7.3. Амплификация гена 16S рРНК

Амплификацию гена 16S рРНК проводили с использованием следующих наборов реактивов:

Реакционная смесь GenPak® Real-Time PCR Core (Изоген, Россия, номер в каталоге U 1011). В состав реакционной смеси объемом 20 мкл входили: 10 мкл ПЦР растворителя (PCR diluent), смесь праймеров – 2,5 мкл, образец ДНК – 7,5 мкл, лиофилизованная Taq ДНК полимеразы, дезоксинуклеозидтрифосфаты и хлорид магния с конечными концентрациями, соответственно, 200 мкМ и 2,5 мМ.

Реакционная смесь PCR Master Mix (ThermoScientific, номер в каталоге K0172). В состав реакционной смеси объемом 50 мкл входили: 25 мкл PCR MasterMix (2X), смесь праймеров – 2 мкл (27f – 1 мкл, 1492r – 1 мкл), образец ДНК – 8 мкл, 15 мкл воды (nuclease-free), входящей в набор.

Были использованы универсальные бактериальные праймеры 27f (aga gtt tga tcc tgg ctc ag) и 1492r (tac ggy tac ctt gtt acg act t), синтезированные фирмой Синтол (Москва).

ПЦР проводили в амплификаторе Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США), используя программу: (1) 94°C - 5 минут, (2) 30 циклов с чередованием

температурных интервалов 94°C – 1 минуту, 51°C – 1 минуту, 72°C – 2 минуты, (3) 72°C – 7 минут.

Анализ продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле с использованием трис-боратного буфера TBE (10X, Fermentas, номер в каталоге B52) (рабочая концентрация 1X: 89 mM Tris, 89 mM борная кислота, 2 mM EDTA) при напряженности электрического поля 7,6 В/см (источник питания PowerPac Basic, Bio-Rad; камера для электрофореза Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad).

2.7.4. Секвенирование фрагментов ДНК

Очистку продуктов ПЦР осуществляли методом прямого переосаждения ДНК в мягких условиях (0,125 M ацетата аммония в 70% этиловом спирте)¹⁶. Реакцию секвенирования проводили с использованием универсальных бактериальных праймеров: 27f (aga gtt tga tcc tgg ctc ag), 341f (cct acg gga ggc agc ag), 785f (ggm tta gat acc tgg tag tcc), 519r (gta tta ccg cgg ctg ctg), 907r (ccg tca att cct ttg agt tt), 1492r (tac ggy tac ctt gtt acg act t) [James, 2010]. Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов осуществляли по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США).

2.7.5. Анализ генных последовательностей ДНК

Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК были отредактированы с помощью программы BioEdit v. 7.2.5 [Hall, 1999]. Для сборки полных нуклеотидных последовательностей использовали программу Мега 6 [Tamura, 2013]. Для выравнивания последовательностей и построения филогенетического дерева использовали нуклеотидные последовательности гена

¹⁶ http://www.genome-centre.ru/downloads/NH4Ac_EtOH.pdf

16S рРНК типовых штаммов из баз данных GenBank¹⁷ и Ribosomal Database Project (RDP)¹⁸.

2.8. Хранение бактериальных продуцентов антибиотиков

Штаммы бактериальных продуцентов антибиотиков поддерживали регулярными посевами раз в 10-60 дней в зависимости от штамма. Для длительного хранения осуществляли лиофилизацию в стерильных ампулах. Для этого перед началом лиофилизации проводили подготовку материала: стеклянные ампулы (нейтральное стекло, диаметр 7 мм, длина 110 мм) тампонируют рыхлыми пробками из хлопковой ваты на глубину 1 см от края ампулы и стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 45 минут. В качестве защитной среды использовали сухое молоко для бактериологических целей (Difco, США) (5% водная суспензия), которое разливали в стеклянные пробирки объемом 12 мл по 5 мл, три раза стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм в течение 20 минут и проверяли стерильность. С пробирок со скошенным агаром производили смыв культуры водной суспензией молока в пробирку. В подготовленные стерильные ампулы разливали примерно по 0,15 мл суспензии клеток или спор микроорганизмов. Один образец суспензии использовали для подтверждения жизнеспособности культуры перед лиофилизацией, для чего осуществляли его высев на поверхность агаризованной среды. Замораживание ампул с суспензией клеток проводили в кельвинаторе при -70°C в течение 10 часов. Лиофилизация культур проводилась в лиофильной сушилке Heto Power Dry LL3000 (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре от -58°C до -60°C в течение 4-6 часов. По окончании процесса лиофилизации ампулы запаивали под вакуумом газовой горелкой при температуре 1300°C . Перед закладкой на хранение одну из ампул вскрывали и высевали на агаризованную среду для проверки сохранности

¹⁷ URL: www.ncbi.nlm.nih.gov

¹⁸ URL: <http://www.cme.msu.edu>

жизнеспособности после сушки и помещали в термостат на 28°C или 37°C в зависимости от объекта. Ампулы с лиофилизированными культурами хранили в холодильнике при -16°C. Первую проверку сохранности (жизнеспособности) лиофилизированных культур проводили через 6 месяцев, затем раз в 1-3 года.

2.9. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов проводилась с определением стандартного отклонения по формуле [Платонов, 2000]:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}} \quad (1),$$

где n — число случаев, \bar{x} — среднее арифметическое, x_i — значение в i -ом случае.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Подбор тест-системы для отбора штаммов – продуцентов антибиотиков

Для эффективного лечения при назначении курса антибиотикотерапии следует выделить штамм возбудителя заболевания и определить его устойчивость или чувствительность к антибиотикам медицинского назначения. Если такая возможность отсутствует, то антибиотикотерапию назначают эмпирически, ориентируясь на спектр антимикробной активности антибиотиков к наиболее вероятному возбудителю заболевания. По спектрам активности антибактериальные антибиотики делятся на антибиотики широкого спектра действия, эффективные в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, и антибиотики узкого спектра действия, эффективные в отношении только грамположительных бактерий. В медицинской практике такое деление носит более конкретный и частный характер, при этом учитывают природу патогенной бактерии, токсичность антибиотика, а также частоту встречаемости антибиотикорезистентных форм среди вариантов конкретного вида патогена, а также учитывают состояние пациента. Если патогенный штамм невосприимчив одновременно к целому ряду лекарственных препаратов разного химического строения и с разным механизмом действия, такой штамм рассматривают как обладающий множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ, MDR – multi drug resistance)¹⁹ [Навашин, 1994; Козлов, Страчунский, 2009].

Для описания антибиотической активности в данном исследовании были выбраны указанные выше (раздел 2.3) тест-штаммы:

- грамположительные (9 штаммов) и грамотрицательные бактерии (3 штамма) для описания широкого/узкого спектра антимикробной активности;

¹⁹ <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>

- два штамма золотистого стафилококка, отличающихся по признаку метициллинрезистентности (methicillin resistant *S. aureus* INA 00761 (MRSA) и methicillin sensitive *S. aureus* FDA 209P (MSSA)) для выявления антибиотиков, преодолевающих данный тип резистентности; штамм INA 00761 обладает множественной лекарственной устойчивостью;

- штамм *L. mesenteroides* VKPM B-4177 с высоким уровнем устойчивости к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина для выявления антибиотиков, преодолевающих данный тип резистентности;

- штамм синегнойной палочки *P. aeruginosa* ATCC 27853 с множественной лекарственной устойчивостью;

- два грибных штамма *A. niger* INA 00760 и *Sac. cerevisiae* RIA 259 включены в список тест-штаммов для определения противогрибковой активности;

- штаммы *Myc. smegmatis* VKPM Ac 1339 и *Myc. smegmatis* mc² 155 использовали для первичного скрининга противотуберкулезной активности, в случае выделенных и химически идентифицированных антибиотических веществ.

В приложении на страницах 141-145 приводятся таблицы по чувствительности к антибиотикам медицинского назначения тест-штаммов *S. aureus* INA 00761 (MRSA), *S. aureus* FDA 209P (MSSA), *L. mesenteroides* VKPM B-4177, *P. aeruginosa* ATCC 27853, и штаммов *Myc. smegmatis* VKPM Ac 1339 и mc² 155 к противотуберкулезным препаратам I и II ряда.

3.2. Выделение бактерий из различных природных источников и изучение потенциальных продуцентов антибиотиков

Почвенные актинобактерии и грибы стали в этом отношении хорошо изученными объектами [Bérdy, 2005]. В связи с этим для поиска новых антибиотиков представляются перспективными трудно культивируемые микроорганизмы, представители редких таксономических групп или микроорганизмы, выделенные из ранее неисследованных природных источников. В соответствии с целью исследования в данном разделе приводятся результаты

изучения бактерий, выделенных из почвы, а также из мало исследованных в этом отношении природных источников.

3.2.1. Бактерии – продуценты антибиотиков, выделенные из почвы Краснодарского края

Ранее в ФГБНУ «НИИНА» были исследованы актинобактерии, выделенные из образца почвы выщелоченного чернозема Краснодарского края [Грузина, 2003]. Нашей задачей было выделение и анализ бактерий других таксономических групп прокариот из того же образца почвы. Из рассевов суспензии почвы на агаровой среде №2 Гаузе было получено около 15000 колоний, из которых для дальнейшего исследования отобрано 204 штамма бактерий, отличающихся по морфологическим признакам (размерам и форме колоний, цвету, наличию экзопигмента и его окраске). Среди 204 штаммов антибиотическая активность была обнаружена у 11 (таблица 8). Из них только 4 штамма (INA 01087, INA 01168, INA 01187 и INA 01188) ингибировали рост грамотрицательных тест-бактерий, при этом активностью в отношении антибиотикорезистентного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 на достаточно высоком уровне обладал штамм INA 01168. Большинство изученных штаммов ингибировали рост грамположительных тест-бактерий, среди них штаммы INA 01087, INA 01169 – INA 01172 проявили наиболее высокую активность в отношении резистентного и чувствительного штаммов золотистого стафилококка (*S. aureus* INA 00761 и FDA 209P, соответственно). Кроме того, штаммы INA 01087, INA 01169 – INA 01172 обладают противогрибковой активностью. Таким образом, учитывая высокую активность в отношении двух штаммов *S. aureus* INA 00761 (MRSA) и FDA 209P (MSSA) и штамма *L. mesenteroides* VKPM B-4177, штамм INA 01087 был отобран как продуцент высокоактивного антибиотика широкого спектра действия.

Таблица 8. Зоны задержки роста тест-организмов под действием культуральной жидкости бактерий, выделенных из почвы Краснодарского края.

Штаммы	Пик активности (сутки)*	Зоны задержки роста тест-штаммов в мм											
		<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. mycooides</i> 537	<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Aspergillus niger</i> INA 00760
4071	4	17,3±2,1	16,0±1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	17,7±0,6	11,7±1,5	0	0	0	12,7±0,6	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus simplex</i> INA 01168	4	0	0	0	0	0	0	10,7±0,6	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	13,3±1,2	0	0	21,7±2,5	12,3±1,7	0	0
<i>Bacillus pumilus</i> INA 01170	2	25,3±0,6	0	0	0	0	11,7±1,5	0	0	0	0	0	27,7±1,5
	4	23,7±1,5	19,0±0,0	0	0	0	13,3±0,6	13,0±2,7	0	0	0	20,0±2,0	17,3±2,1
<i>Bacillus pumilus</i> INA 01087	2	27,7±0,6	28,0±0,0	10,7±0,6	10,3±0,6	0	28,7±2,7	25,0±2,0	20,7±0,6	0	0	14,7±1,6	11,3±1,6
	4	23,7±3,2	18,3±1,6	0	0	0	16,7±1,5	13,0±2,7	0	0	0	16,7±1,5	19,3±0,6

Продолжение таблицы 8.

Штаммы	Пик активности (сутки)*	Зоны задержки роста тест-штаммов в мм											
		<i>Staphylococcus Aureus</i> INA 00761	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. mycoides</i> 537	<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Aspergillus niger</i> INA 00760
<i>Bacillus simplex</i> INA 01186	2	17,7±1,5	16,0±0,0	0	0	0	14,0±1,7	0	0	0	0	0	0
	7	15,7±1,5	20,7±0,6	11,3±1,6	0	0	16,3±0,6	0	0	0	0	0	11,7±1,5
<i>Brevibacillus borstelensis</i> INA 01187	4	15,7±0,6	18,3±0,6	16,0±1,0	0	0	18,0±2,7	0	0	0	0	0	0
	7	14,0±1,7	14,3±2,1	15,3±0,6	0	0	20,3±0,6	0	0	0	12,3±0,6	0	11,0±1,0
<i>Brevibacillus borstelensis</i> INA 01188	2	14,3±0,6	15,7±1,6	14,3±1,5	0	0	0	10,0±0,0	0	0	0	0	0
	7	13,7±0,6	14,3±1,5	14,0±1,7	0	0	20,0±2,0	0	0	0	12,0±1,7	0	11,7±1,5
<i>Bacillus pumilus</i> INA 01169	2	31,7±2,1	27,7±0,6	0	0	0	14,0±1,7	0	0	0	0	0	22,3±2,1
	7	21,3±1,5	20,0±0,0	0	0	0	0	11,3±0,6	0	0	0	0	12,0±0,0

Продолжение таблицы 8.

Штаммы	Пик активности (сутки)*	Зоны задержки роста тест-штаммов в мм											
		<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. mycooides</i> 537	<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Aspergillus niger</i> INA 00760
<i>Bacillus pumilus</i> INA 01189	2	17,0±0,0	23,7 ±2,1	0	0	0	15,0 ±1,0	0	0	0	0	0	22,7 ±0,6
	7	20,3±0,6	12,7 ±1,5	0	0	0	0	11,7 ±0,6	0	0	0	0	13,0 ±2,7
<i>Bacillus pumilus</i> INA 01171	2	25,7±1,6	30,3 ±1,5	0	0	0	15,7 ±2,1	0	0	0	0	0	28,3 ±2,1
	7	23,0±2,0	21,3 ±0,6	0	0	0	11,3 ±1,6	13,7 ±0,6	0	0	0	21,3 ±1,5	16,7 ±0,6
<i>Bacillus pumilus</i> INA 01172	2	28,7±1,5	29,0 ±1,0	0	0	0	0	14,3 ±0,6	0	0	0	0	19,3 ±1,7
	7	23,0±0,0	21,7 ±1,5	0	0	0	0	12,0 ±0,0	0	0	0	19,7 ±1,5	11,3 ±1,6

5/

Примечание: * Зоны задержки роста указаны для пиковых значений антибиотической активности в культуральной жидкости; 0 – зон активности нет.

Для видовой идентификации был проведен анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (таблица 9).

Таблица 9. Определение видовой принадлежности штаммов, выделенных из почвы Краснодарского края по анализу нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК.

Штамм	Длина прочтения ДНК (н.о.)	Совпадение (%)	ID GenBank*
<i>Bacillus pumilus</i> INA 01087	1503	99,8	KF17600
<i>Bacillus pumilus</i> INA 01169	1341	100	MH319483
<i>Bacillus pumilus</i> INA 01171	1381	100	MH319484
<i>Bacillus simplex</i> INA 01168	1032	99,1	MH319480
<i>Bacillus simplex</i> INA 01186	1361	98,7	MH319481
<i>Brevibacillus borstelensis</i> INA 01188	1337	100	MH319482

Примечание: *номера последовательностей ДНК, депонированных в базу данных GenBank.

3.2.2. Бактерии – продуценты антибиотиков, выделенные из многолетнемерзлой почвы Антарктики

Штаммы были получены из Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (Москва) от профессора Г.И. Эль-Регистан.

Биосинтез и последующее определение антибиотической активности проводили описанным выше методом. Установлено, что из 32 штаммов 13 проявляют антибиотическую активность (таблица 10). Из них антимикробную активность в отношении тест-штамма *L. mesenteroides* VKPM B-4177 (VR) проявили: INA 01149, INA 01150, INA 01151, INA 01153, INA 01154 и INA 01155. Кроме того, INA 01154, INA 01155 и INA 01165 подавляли рост тест-штамма

MRSA. Противогрибковой активностью обладали 3 штамма (4788, INA 01151 и INA 01154). Идентификацию перспективных штаммов-продуцентов антибиотиков проводили по анализу последовательности гена 16S рРНК (таблица 11). Все выявленные продуценты заложены на длительное хранение в лиофилизированном виде. Последовательности гена 16S рРНК депонированы в базу данных GenBank под номерами MF186223-MF186225, MF186227-MF186229 и MF278747.

Таблица 10. Зоны задержки роста тест-штаммов под действием культуральной жидкости бактерий, выделенных из многолетнемерзлой почвы Антарктики.

Штаммы	Пик активности (сутки)*	Зоны задержки роста тест-штаммов в мм											
		<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. mycooides</i> 537	<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Aspergillus niger</i> INA 00760
<i>Bacillus mojavensis</i> INA 01149	2	0	19,7 ±0,6	0	0	0	19,0±2,6	13,3±2,5	11,6 ±2,1	0	15,6 ±0,6	0	0
<i>B. subtilis</i> INA 01150	2	0	24,7 ±2,1	0	0	0	22,0±1,0	18,0±2,6	20,7 ±0,6	0	11,7 ±1,2	0	0
4788	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10,7 ±0,6
4790	7	12,3 ±1,5**	0	12,0 ±0,0	12,0 ±1,7	14,0 ±1,0	14,3±0,6	0	0	0	16,3 ±1,5	0	0
4794	2	0	0	0	0	0	0	0	12,7 ±0,6	0	0	0	0
4795	2	0	15,7 ±1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Продолжение таблицы 10.

Штаммы	Пик активности (сутки)*	Зоны задержки роста тест-штаммов в мм											
		<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. mycooides</i> 537	<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Aspergillus niger</i> INA 00760
<i>B. mojavensis</i> INA 01151	7	0	0	0	0	0	19,3±1,5	13,7±3,5	18,7 ±1,5**	0	0	14,3 ±2,1	15,3 ±0,6
4804	2	0	0	15,0 ±1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4805	2	0	0	12,3 ±2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	15,3±0,6**	0	0	0	10,7 ±0,6	0	0
<i>B. safensis</i> INA 01153	2	0	0	0	0	0	0	17,7±2,5	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	19,7±1,5	0	0	0	0	0	0
<i>B. safensis</i> INA 01154	2	17,3 ±1,2	0	0	0	0	0	16,6±1,5	0	0	0	0	0
	7	11,3 ±0,6	19,3 ±2,1	11,3 ±1,2**	0	0	0	0	0	12,3 ±1,2	0	16,0 ±1,0	0

Продолжение таблицы 10.

Штаммы	Пик активности (сутки)*	Зоны задержки роста тест-штаммов в мм											
		<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. mycooides</i> 537	<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Aspergillus niger</i> INA 00760
<i>B. licheniformis</i> INA 01155	2	15,6±1,2	13,7 ±1,5	14,3 ±2,5	14,0 ±1,0	17,0 ±2,6	11,7 ±1,5	21,0±2,6	14,3 ±0,6	0	16,7 ±0,6	0	0
<i>Gordonia terrae</i> INA 01165	2	11,3±1,2	11,7 ±0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	17,7 ±2,5	0	0	0	0	0	0

Примечание: * Зоны задержки роста указаны для пиковых значений антибиотической активности в культуральной жидкости; ** зоны угнетения роста; 0 – зон активности нет.

Таблица 11. Определение видовой принадлежности бактерий, выделенных из многолетнемерзлой почвы Антарктики, по анализу нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК.

Штаммы	Длина прочтения ДНК (н.о.)	Совпадение (%)	ID GenBank*
<i>Bacillus licheniformis</i> INA 01155	1359	98,1	MF186229
<i>B. mojavensis</i> INA 01149	1373	99,2	MF186223
<i>B. mojavensis</i> INA 01151	1377	99,2	MF186225
<i>B. safensis</i> INA 01153	1384	100	MF186227
<i>B. safensis</i> INA 01154	1350	100	MF186228
<i>B. subtilis</i> INA 01150	1366	100	MF186224
<i>Gordonia terrae</i> INA 01165	1370	99,5	MF278747

Примечание: * номера последовательностей ДНК, депонированных в базу данных GenBank.

3.2.3. Бактерии – продуценты антибиотиков, выделенные из плодовых тел базидиальных грибов

В ходе эволюции между бактериями и высшими грибами выработались многосторонние сложные взаимоотношения, в которых большую роль играют их метаболиты, такие как ферменты, органические кислоты, биорегуляторы, пигменты, антибиотики [Leveau, Preston, 2007; Kobayashi, Crouch, 2009]. Ранее в ходе изучения культивируемых видов высших грибов нами было отмечено, что многие из бактериальных эндобионтов плодовых тел грибов образуют антибиотики. Одной из задач настоящей работы было выделить бактерии-эндобионты из плодовых тел базидиальных грибов и определить их антимикробную активность, в том числе в отношении антибиотикорезистентных тест-штаммов.

При высеве кусочка ткани плодового тела гриба на питательную среду наблюдали следующие варианты роста: гриба, гриба и бактерий, только бактерий или отсутствие роста (рисунок 10). В случае высевов бактерий из внутренних

тканей плодовых тел в подавляющем большинстве случаев наблюдали рост морфологически однородных колоний, в редких случаях бактериальные колонии были двух или трех морфологических типов.

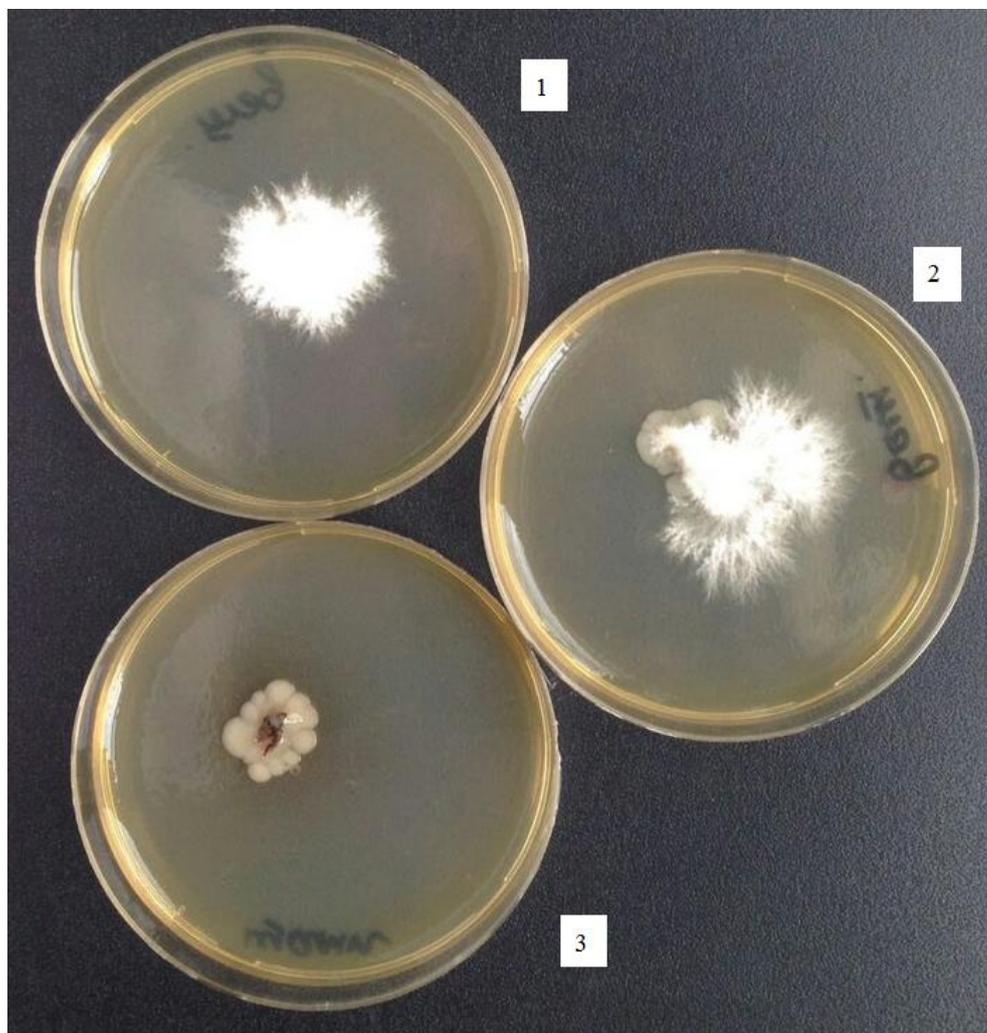


Рисунок 10. Варианты роста при переносе кусочка ткани плодового тела гриба на питательную среду (гриб (1), гриб и бактерия (2), только бактерия (3)).

В общей сложности из 86 плодовых тел грибов выделено 93 штамма бактерий и исследована их способность образовывать антибиотические вещества в условиях глубинного культивирования. Обнаружено, что 79 (84,9%) штаммов обладают антимикробной активностью, при этом противогрибковой активностью – только 17 (18,3%) бактерий-эндобионтов (таблица 12).

Таблица 12. Деление бактериальных эндобионтов по группам в зависимости от спектров антибиотической активности.

Группы	Группы бактериальных эндобионтов	Число штаммов	%
	Общее число эндобионтов, у которых определен спектр антибиотической активности	93	100
	Штаммы, у которых не обнаружено антибиотической активности	14	15,1
	Штаммы, обладающие антибиотической активностью	79	84,9
1	Штаммы с активностью в отношении грамположительных бактерий, грамотрицательных бактерий и грибов	7	7,5
2	Штаммы с активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий	34	36,5
3	Штаммы с активностью в отношении грамположительных бактерий и грибов	5	5,4
4	Штаммы с активностью в отношении грамположительных бактерий	28	30,1
5	Штаммы с активностью в отношении грибов	5	5,4
1+3+5	Штаммы с активностью в отношении грибов независимо от наличия или отсутствия антибактериальной активности	17	18,3

Для дальнейшего изучения было отобрано 18 штаммов бактерий с разными антибиотическими спектрами, относящимися к разным группам (таблица 12 и 13). Отобранные 18 бактерий были выделены из 14 плодовых тел разных видов базидиальных грибов, видовая идентификация этих бактерий представлена в таблицах 14 и 15. Полученные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК депонированы в базу данных GenBank под номерами KF311227, KF311228, KX098334, KX129822-KX129834, MG597142, MG597143.

Таблица 13. Зоны задержки роста тест-штаммов под действием культуральной жидкости бактерий, выделенных из плодовых тел базидиальных грибов.

№ Группы	Штаммы	Пик активности (сутки)*	Зоны задержки роста тест-штаммов в мм											
			<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. mycooides</i> 537	<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Aspergillus niger</i> INA 00760
1	<i>Bacillus subtilis</i> INA 01085	2	28,7 ±1,5	29,7 ±0,6	11,0 ±1,0	14,3 ±2,1	23,7 ±1,5	32,3 ±1,5	16,7 ±0,6	19,0 ±1,0	0	14,0 ±1,0	25,7 ±1,5	15,3 ±1,5
	<i>B. subtilis</i> INA 01086	2	27,3 ±0,6	25,3 ±1,2	11,3 ±1,2	13,0 ±1,0	17,0 ±1,7	21,7 ±0,6	16,0 ±1,0	24,3 ±1,2	0	16,7 ±0,6	26,7 ±1,2	15,0 ±2,6
		4	29,7 ±0,6	31,0 ±1,0	11,3 ±0,6	11,0 ±1,0	25,7 ±1,5	27,7 ±1,2	14,3 ±0,6	0	0	0	22,3 ±1,5	11,7 ±1,5
	<i>B. subtilis</i> INA 01132	2	14,3 ±1,2	-	12,0 ±1,0	0	-	-	0	0	0	-	13,0 ±1,7	-
		7	13,3 ±1,2	-	11,7 ±0,6	0	-	-	10,7 ±1,2	15,3 ±1,5	0	-	15,3 ±0,6	-
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> INA 01137	2	17,7 ±1,5	15,7 ±0,6	16,0 ±0,0	0	16,0 ±1,0	22,3 ±2,1	0	11,7 ±0,6	0	0	-	-
		7	-	-	0	0	0	-	0	0	0	0	0	13,7 ±1,5
	2	<i>M.terreus</i> INA 01130	7	12,7± 0,6	20,0 ±0,0	12,0± 1,0	10,3 ±0,6	0	0	0	18,7 ±0,6	15,3 ±1,5	-	0

Продолжение таблицы 13.

№ группы	Штаммы	Пик активности (сутки)*	Зоны задержки роста тест-штаммов в мм											
			<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. mycoides</i> 537	<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Aspergillus niger</i> INA 00760
2	<i>Achromobacter spanius</i> INA 01138	2	0	0	10,3 ±0,6	14,3 ±1,2	0	-	-	10,0 ±0,0	0	-	-	0
		4	-	14,0 ±1,0	11,7 ±0,6	-	20,0 ±1,0	-	-	0	0	-	-	0
		7	0	-	0	16,7 ±0,6	-	-	-	-	17,3 ±1,2	-	-	-
	<i>Pseudomonas reinekei</i> INA 01139	2	12,0 ±0,0	0	14,7 ±1,5	13,7 ±0,6	12,7 ±2,3	0	0	0	13,3 ±0,6	12,0 ±0,0	0	0
		<i>B. licheniformis</i> INA 01140	2	-	-	15,0 ±1,0	20,3 ±1,5	-	-	21,7 ±0,6	21,3 ±2,1	0	18,3 ±0,6	0
	7		-	18,3 ±1,2	0	14,0 ±0,0	-	29,7 ±0,6	17,0 ±1,0	0	0	0	0	0
	<i>P. koreensis</i> INA 01166	4	15,7 ±0,6	15,0 ±0,0	14,3 ±2,1	11,7 ±0,6	0	0	0	0	0	10,7 ±0,6	0	0
		7	14,7± 0,6	12,7± 0,6	14,3± 0,6	0	0	13,0 ±1,0	0	0	13,3± 0,6	0	0	0

Продолжение таблицы 13.

№ группы	Штаммы	Пик активности (сутки)*	Зоны задержки роста тест-штаммов в мм												
			<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. mycoides</i> 537	<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Aspergillus niger</i> INA 00760	
3	<i>Ewingella americana</i> INA 01136	2	19,0 ±2,0	12,7 ±0,6	13,0 ±0,0	11,7 ±1,5	16,3 ±0,6	18,0 ±1,0	0	0	0	0	-	0	
		7	-	-	0	0	0	-	0	0	0	0	0	11,7 ±1,5	
	<i>Hafnia paralvei</i> INA 01141	2	0	0	11,7 ±0,6	13,3 ±1,2	12,7 ±2,1	0	0	0	0	0	0	0	14,3 ±2,1
		<i>Ew. americana</i> INA 01142	2	0	0	11,7 ±0,6	0	11,0 ±1,0	0	0	0	0	0	0	11,3 ±1,2
4	<i>Nocardia coeliaca</i> INA 01131	2	10,7 ±0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	
		<i>N. coeliaca</i> INA 01135	4	0	0	0	0	0	12,0 ±1,0	0	0	0	-	0	0
	<i>Ew. americana</i> INA 01167	4	0	0	12,0 ±0,0	11,7 ±0,6	15,0 ±1,0	10,3 ±0,6	0	0	0	0	0	0	
		7	12,3 ±1,2	13,0 ±1,0	0	0	15,0 ±0,0	14,3 ±2,1	0	0	0	0	0	0	

Продолжение таблицы 13.

№ группы	Штаммы	Пик активности (сутки)*	Зоны задержки роста тест-штаммов в мм											
			<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. mycooides</i> 537	<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Aspergillus niger</i> INA 00760
5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> INA 01133	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22,7 ±1,5
	<i>St. maltophilia</i> INA 01134	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23,7 ±0,6
	<i>Ew. americana</i> INA 01143	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15,7 ±1,5

Примечание: * Зоны задержки роста указаны для пиковых значений антибиотической активности в культуральной жидкости; 0 – зон активности нет.

Таблица 14. Идентификация грибов и бактериальных эндобионтов, выделенных из плодовых тел этих грибов.

Грибы (семейство, вид)	Бактериальные эндобионты грибов (вид, штамм)
<i>Fistulinaceae</i>	
<i>Fistulina hepatica</i> (Schaeff.) With. 1801 Печеночница обыкновенная	<i>Hafnia paralvei</i> sp. nov. Huys et al. 2010, штамм INA 01141
<i>Marasmiaceae</i>	
<i>Marasmius oreades</i> (BOLTON) FR., 1836 Опёнок луговой	<i>Pseudomonas reinekei</i> Cámara et al. 2007, sp. nov., штамм INA 01139
<i>Marasmius alliaceus</i> (JACQ.) FR. 1838 Чесночник большой	<i>P. koreensis</i> Kwon, et al. 2003, штамм INA 01166
<i>Mycenaceae</i>	
<i>Mycena flavoalba</i> (Fr.) Qué. Мицена желтовато-белая	<i>Achromobacter spanius</i> Coenye et al. 2003, штамм INA 01138
<i>Phallaceae</i>	
<i>Phallus impudicus</i> L., 1753 Веселка обыкновенная	<i>Bacillus licheniformis</i> (Weigmann 1898) Chester 1901, штамм INA 01140
<i>Polyporaceae</i>	
<i>Phaeolus schweinitzii</i> (Fr.) Pat. 1900 Трутовик Швейница	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Hugh 1981) Palleroni et Bradbury 1993, штамм INA 01133
<i>Polyporus squamosus</i> (HUDS.) FR., 1821 Трутовик чешуйчатый	<i>St. maltophilia</i> (Hugh 1981) Palleroni et Bradbury 1993, штамм INA 01134
<i>Руснопорус cinnabarinus</i> (JACQ.) P.KARST., 1881 Пикнопорус киноварно-красный	<i>Nocardia coeliaca</i> (Gray et Thornton 1928) Waksman et Henrici 1948, штаммы INA 01131 и INA 01135,
<i>Trametes pubescens</i> (Schumach.) Pilát 1939 Траметес пушистый	<i>Ewingella americana</i> sp. nov. Grimont et al. 1984., штамм INA01167
<i>Psathyrellaceae</i>	
<i>Coprinellus micaceus</i> (BULL.) VILGALYS, HOPPLE & JACQ. JOHNSON, 2001 Навозник мерцающий	<i>Ew. americana</i> Grimont et al. 1984, штамм INA 01136
	<i>St. rhizophila</i> sp. nov. Wolf et al. 2002, штамм INA 01137
<i>Russulaceae</i>	
<i>Lactarius rufus</i> (SCOP.) FR. 1838 Горькушка	<i>Micrococcus terreus</i> sp. nov. Zhang et al. 2010, штамм INA 01130
<i>Creolophus cirrhatus</i> (Pers.) P. Karst., 1879 Креолофус кудрявый	<i>Ew. americana</i> Grimont et al. 1984., штаммы INA 01142 и INA 01143

Продолжение таблицы 14.

<i>Strophariaceae</i>	
<i>Stropharia aeruginosa</i> (CURTIS) QUEL., 1872 Строфария сине-зеленая	<i>B. subtilis</i> (Ehrenberg 1835) Cohn 1872, штамм INA 01132
<i>Pholiota squarrosa</i> (OEDER) P.KUMM., 1871 Чешуйчатка обыкновенная	<i>B. subtilis</i> (Ehrenberg 1835) Cohn 1872, штаммы INA 01085 и INA 01086

Таблица 15. Определение видовой принадлежности бактерий-эндобионтов по анализу нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК.

Штаммы	Длина прочтения ДНК (н.о.)	Совпадение (%)	ID GenBank ¹
Грамположительные бактерии:			
<i>Bacillaceae</i>			
<i>Bacillus licheniformis</i> INA 01140	671	100**	KX129831
<i>B. subtilis</i> INA 01085	1091	100**	KF311228
<i>B. subtilis</i> INA 01132	754	99,3**	KX098334
<i>B. subtilis</i> INA 01086	958	100**	KF311227
<i>Micrococcaceae</i>			
<i>Micrococcus terreus</i> INA 01130	648	99,8**	KX129822
<i>Nocardiaceae</i>			
<i>Nocardia coeliaca</i> INA 01131	1361	100**	KX129823
<i>Nocardia coeliaca</i> INA 01135	1293	100**	KX129826
Грамотрицательные бактерии:			
<i>Pseudomonadaceae</i>			
<i>Pseudomonas reinekei</i> INA 01139	1357	98,2	KX129830
<i>Pseudomonas koreensis</i> INA 01166	684	99,4**	MG597142
<i>Xanthomonadaceae</i>			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> INA 01133	549	100*	KX129824
<i>St. maltophilia</i> INA 01134	349	100**	KX129825
<i>St. rhizophila</i> INA 01137	704	100**	KX129828
<i>Enterobacteriaceae</i>			
<i>Ewingella americana</i> INA 01136	1362	99*	KX129827
<i>Ew. americana</i> INA 01142	1407	99*	KX129833
<i>Ew. americana</i> INA 01143	942	100*	KX129834
<i>Ew. americana</i> INA 01167	1382	98,9**	MG597143
<i>Hafnia paralvei</i> INA 01141	642	98,1**	KX129832

Продолжение таблицы 15.

Штаммы	Длина прочтения ДНК (н.о.)	Совпадение (%)	ID GenBank ¹
<i>Alcaligenaceae</i>			
<i>Achromobacter spanius</i> INA 01138	636	99,5**	KX129829

Примечание: ¹ номера последовательностей ДНК, депонированных в базу данных GenBank; * NCBI GenBank; ** Ribosomal Database Project.

Следует отметить, что штаммы INA 01136 (*E. americana*) и INA 01137 (*St. rhizophila*) выделены из одного плодового тела навозника мерцающего (*Coprinellus micaceus*). При этом штамм INA 01136 обладает антибиотической активностью узкого спектра действия, действуя только на грамположительные бактерии, и на достаточно высоком уровне ингибирует рост тест-штамма *S. aureus* INA 00761 (MRSA), а штамм INA 01137 подавляет рост грамположительных тест-бактерий и кишечной палочки. Штаммы *N. coeliaca* INA 01131 и INA 01135 так же выделены из одного плодового тела (*Pycnoporus cinnabarinus*) и обладают различным антимикробным действием, INA 01131 подавляет рост резистентного штамма *S. aureus* INA 00761, а INA 01135 – *M. luteus* NCTC 8340. Штаммы *B. subtilis* INA 01085 и INA 01086 были выделены из одного плодового тела чешуйчатки обыкновенной (*Pholiota squarrosa*), отбор проводили по различию морфологических признаков; несмотря на то, что они обладают одинаковым антимикробным спектром действия, в последующих исследованиях установлено, что они образуют различные антибиотики, но близкие по строению.

3.2.4. Анализ полученных данных по различным источникам бактерий – продуцентов антибиотиков

В таблице 16 на основании полученных результатов представлены суммарные данные по выделенным из разных источников бактериям, количеству

продуцентов, и числу бактерий, активных в отношении антибиотикорезистентных патогенов.

Таблица 16. Анализ различных источников бактерий – продуцентов антибиотиков.

Источник бактерий	Общее количество выделенных бактерий		Количество антибиотически активных бактерий		Бактерии активные в отношении антибиотикорезистентных микроорганизмов					
					<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	п	%	п	%	п	%	п	%	п	%
Почва Краснодарского края	204	100	11	5,4	10	4,9	7	3,4	1	0,5
Многолетнемерзлая почва Антарктики	32	100	13	40,6	3	9,4	6	18,8	1	3,1
Плодовые тела базидиальных грибов	93	100	79	84,9	31	33,3	5	5,4	20	21,5

По данным таблицы 16 нельзя провести сравнительный анализ источников продуцентов антибиотиков, но можно заключить, что из каждого источника можно выделить бактерии, обладающие активностью в отношении антибиотикорезистентных тест-штаммов.

В ходе проведенного исследования обнаружено, что лишь малая часть бактериальных штаммов, выделенных из почвы Краснодарского края, обладает антимикробной активностью (5,4%) (таблица 16). Однако, присутствуют штаммы, проявляющие ингибирующее действие в отношении антибиотикорезистентных форм патогенных микроорганизмов. В отношении штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853, обладающего множественной лекарственной устойчивостью, проявил активность один штамм INA 01168, вероятно, образующий не менее двух

антибиотиков (пик активности в отношении *L. mesenteroides* VKPM B-4177 приходится на четвертые сутки, а в отношении *P. aeruginosa* ATCC 27853 – на седьмые сутки). Высоким уровнем активности в отношении штамма *S. aureus* INA 00761 (MRSA) обладают штаммы INA 01087, INA 01169-INA 01172, среди которых для дальнейшего химического изучения был отобран штамм INA 01087 (раздел 3.3.2), обладающий также высоким уровнем антимикробной активности в отношении антибиотикорезистентного штамма *L. mesenteroides* VKPM B-4177 (VR).

Выявленные штаммы-продуценты антибиотиков из многолетнемерзлой почвы Антарктики относятся к спорообразующим бактериям. Представители рода *Bacillus* являются наиболее часто встречающимися продуцентами антибиотиков среди эубактерий. Их вторичные метаболиты обладают широким спектром антибиотической активности и большим разнообразием структур, благодаря чему они являются ценным источником для поиска потенциальных антибиотиков медицинского назначения. Штаммы *Bacillus* spp. способны образовывать рибосомно синтезированные антимикробные пептиды (АМП), множество нерибосомно синтезированных АМП, поликетидные антибиотики, противогрибковые липопептидные антибиотики (итурин, фенгицин) и ризоктицины [Fredenhagen et al., 1995; Bérdu, 2005; Fickers, 2012; Sumi et al., 2015]. Несмотря на существование большого количества описанных антибиотиков, известно, что на сегодняшний день обнаружена лишь малая доля антимикробных молекул [Fickers, 2012], поэтому дальнейшие поиски антибиотиков среди вторичных метаболитов представителей рода *Bacillus* представляются перспективными.

В 2014 году описан штамм *B. mojavensis* CWBI-B1568, выделенный из аридной почвы, обладающий противогрибковой активностью в отношении *Candida albicans*. Ингибирование роста гриба авторы связывают с образованием *B. mojavensis* липопептидов итурина, сурфактина и фенгицина [Yousef-Ali et al., 2014]. Позже, в 2016 году, был описан эндофитный штамм *B. mojavensis* BmB 4, выделенный из стебля *Vasopa monnieri* и проявляющий антибактериальную

активность в отношении *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica* Typhi. Описана способность образовывать данным штаммом сурфактин и фенгицин [Jasim et al., 2016]. В настоящем исследовании впервые описана антимикробная активность двух штаммов *B. mojavensis* INA 01149 и INA 01151 в отношении антибиотикорезистентного штамма *L. mesenteroides* VKPM B-4177 (VR) (таблица 10).

Вид *B. safensis* колонизирует самые разнообразные места обитания, многие из которых являются трудными для выживания других микроорганизмов. Первоначально данный вид был идентифицирован как загрязнитель космического аппарата (SAF) в США, в результате чего получил свое видовое название *B. safensis*. Штаммы *B. safensis* способны продуцировать промышленно важные ферменты, каротиноиды, биосурфактанты, соединения, используемые для стимуляции роста растений, а также их используют в качестве агентов биоконтроля при изучении фитопатогенных грибов [Sun et al., 2013; Domingos et al., 2015; Lateef et al., 2015]. Выделенные нами штаммы INA 01153 и INA 01154 обладают различной антибиотической активностью. Штамм INA 01153 активен только в отношении грамположительных бактерий, причем проявляет активность в отношении ванкомицин-резистентного штамма *L. mesenteroides* VKPM B-4177. Штамм INA 01154, вероятно, синтезирует несколько веществ: на вторые сутки инкубирования этого штамма культуральная жидкость достигает пика активности в отношении антибиотикорезистентных грамположительных бактерий *S. aureus* INA 00761 (MRSA) и *L. mesenteroides* VKPM B-4177 (VR). К седьмым суткам активность в отношении данных тест-бактерий понижается, но достигает наивысшего уровня в отношении грамотрицательной тест-бактерии *P. aeruginosa* ATCC 27853 и дрожжей *Sac. cerevisiae* RIA 259. Такая динамика проявления антимикробной активности в культуральной жидкости штамма INA 01154 позволяет предположить образование не менее двух антибиотических веществ. Из анализа литературы следует, что антибиотической активности у штаммов вида *B. safensis* в отношении тест-штаммов, обладающих лекарственной устойчивостью, ранее описано не было.

Известен ряд соединений, образуемых штаммами *B. licheniformis* – бацилизин, лихенезины, лихеницидин, сурфактины, описана их антимикробная активность в отношении грамположительных бактерий, включая резистентные штаммы *S. aureus*, и грибов [Yakimov et al., 1998; He et al., 2006; Alvarez-Ordóñez et al., 2014; Favaro et al., 2016; Штерншиц с соавт., 2016]. Большой интерес представляют работы, описывающие ингибирующее действие соединений на образование микробных биопленок. Соединения, выделенные из культуральной жидкости *B. licheniformis*, подавляют рост таких микроорганизмов, как *S. aureus*, *B. pumilus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* [Rivardo et al., 2009; Dusane et al., 2013]. Полученный в данной работе штамм *B. licheniformis* INA 01155 обладает противомикробным действием в отношении всех примененных грамположительных тест-бактерий, грамотрицательных бактерий *E. coli* ATCC 25922 и *C. terrigena* VKPM В-7571, но не обладает противогрибковой активностью. Необходимо отметить, что активности в отношении *L. mesenteroides*, по нашим данным, ранее описано не было.

Из почвы Антарктики нами был выделен штамм *Gordonia terrae* INA 01165, проявляющий антимикробную активность в отношении золотистого стафилококка – как резистентного штамма *S. aureus* INA 00761 (MRSA), так и метициллинчувствительного штамма *S. aureus* FDA 209P. Род *Gordonia* филогенетически относится к подпорядку *Corynebacterineae* порядка *Actinomycetales*. Представителей *Gordonia* spp. часто трудно идентифицировать как на уровне рода, так и на уровне вида с помощью микробиологических и биохимических методов анализа. Благодаря применению молекулярных и филогенетических методов классификация рода резко изменилась, несколько видов были переклассифицированы, описано много новых видов [Stackebrandt et al., 1997; Blaschke et al., 2007; Lai et al., 2010]. Местом обитания представителей *Gordonia* spp., описанных в литературе, являются природные источники такие, как почва и ризосфера, промышленные – нефтедобывающие скважины или зараженные углеводородами почвы, и искусственные источники – биореакторы для очистки сточных вод или биофильтры. Описаны виды *Gordonia* spp.,

входящие в симбиотические ассоциации с несколькими хозяевами: водными (морскими и пресноводными) и наземными беспозвоночными [Graça et al., 2013; Sowani et al., 2017]. Кроме этого, некоторые виды *Gordonia* spp. выделены из клинических образцов и являются оппортунистическими патогенами, способными вызывать инфекционные заболевания у людей с пониженным иммунитетом [Blaschke et al., 2007; Lai et al., 2010; Sowani et al., 2017]. Описаны случаи нозокомиальных инфекций, вызванных *Gordonia* spp., связанных с хирургическим вмешательством, легочных заболеваний и инфекций центральной нервной системы у людей с ослабленным иммунитетом [Drancourt et al., 1997; Arenskötter et al., 2004; Lai et al., 2010].

Род *Gordonia* вызывает большой интерес у исследователей в связи со способностью большинства видов разрушать ксенобиотики, утилизировать загрязнения окружающей среды, а также образовывать биологически активные соединения. Штаммы *Gordonia* spp. способны синтезировать биосурфактанты, каротиноиды, имидазолы, гордонан (кислотный полисахарид, вызывающий агрегации клеток) [Arenskötter et al., 2004; Sowani et al., 2017]. Имидазолы широко используются в качестве лекарственных средств, в том числе, в составе антигистаминных препаратов. Некоторые соединения проявляют противогрибковые свойства, другие обладают противосудорожным действием [Mikolasch et al., 2003; Arenskötter et al., 2004]. Разнообразие химических соединений, синтезированных представителями рода *Gordonia*, делает эти бактерии потенциально полезными для экологической, промышленной и медицинской биотехнологии. В 2013 группой ученых из Португалии из морской губки *Erylus discophorus* было выделено несколько штаммов рода *Gordonia*, среди которых штамм *G. terrae* и два штамма *Gordonia* sp. проявляли антимикробную активность в отношении *B. subtilis* и *S. aureus* (MRSA) [Graça et al., 2013]. В 2010 году группой американских ученых у морских представителей рода *Gordonia* выявлены гены поликетидсинтаз и синтетаз нерибосомных пептидов [Gontang et al., 2010]. Таким образом, разнообразие химических соединений, синтезируемых представителями рода *Gordonia*, позволяет рассматривать эти бактерии в качестве

потенциального объекта экологической, промышленной и медицинской биотехнологии.

Ранее описанные гены антибиотикорезистентности прокариот многолетнемерзлых почв Антарктики косвенно указывают на наличие продуцентов антибиотиков в микробиотах этого региона. В результате настоящей работы подтверждено, что в микробиоте многолетнемерзлой почвы Антарктики присутствуют штаммы, обладающие антибиотическими свойствами в отношении микроорганизмов разных таксономических групп. Среди них могут быть продуценты антибиотиков, представляющих интерес для медицины, поскольку некоторые из описанных штаммов активны в отношении антибиотикорезистентных тест-штаммов, в том числе, устойчивых к бета-лактамам и гликопептидным антибиотикам, что делает целесообразным их химическое исследование.

Из плодовых тел базидиальных грибов было выделено 93 штамма бактерий, среди которых 84,9% проявили антимикробную активность в условиях глубинного культивирования. Такой высокий процент, предположительно, можно объяснить конкуренцией бактериальных видов при колонизации плодового тела гриба (таблица 12).

В анализируемой группе из 18 бактериальных эндобионтов есть грамположительные и грамотрицательные бактерии, в общей сложности они представляют 7 семейств и 8 родов (таблица 15), из которых представители 6 родов ранее не были описаны в качестве эндобионтов плодовых тел базидиомицетов. По данным разных авторов, проводивших количественную оценку бактериальных эндобионтов, во внутренних тканях плодовых тел базидиомицетов преобладают грамотрицательные бактерии. Так, в плодовых телах базидиомицетов, собранных в Московской области, доминировали грамотрицательные бактерии родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Mycococcus*. В меньшем количестве присутствовали грамположительные бактерии из родов *Streptomyces*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, причем, в отличие от плодовых тел грибов, в окружающей почве доминировали грамположительные бактерии

указанных четырех родов [Загрядская с соавт., 2013; Загрядская, 2014; Загрядская с соавт., 2015]. Также ранее были изучены культивируемые бактерии-ассоцианты плодовых тел грибов разных видов рода *Cantharellus*, собранных в лесах северо-западных Гималаев. В основном, это грамотрицательные бактерии из родов *Hafnia*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Rahnella*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* и грамположительные бактерии рода *Bacillus*. Основными по численности ассоциантами были виды родов *Hafnia* и *Stenotrophomonas* [Kumari et al., 2012]. В другой работе методом ДНК-фингерпринта анализировали бактериальные сообщества 49 плодовых тел базидиальных грибов. Установлена принадлежность бактерий к 10 семействам, среди которых преобладающими по численности также были грамотрицательные бактерии, относящиеся к семействам *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonodaceae* и *Rhizobiaceae* [de Carvalho et al., 2015].

В нашей работе среди продуцентов антибиотиков выделены представители родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, у которых описаны выделенные из разных источников штаммы, образующие десятки антибиотиков различной химической природы [Смирнов, Киприанова, 1990; Raaijmakers et al., 2010; Fickers, 2012], что, однако, не исключает возможности описания новых антимикробных соединений у данных бактерий.

Грамотрицательная бактерия *St. maltophilia* широко распространена в почве, водоемах, растениях, а также является облигатным патогеном человека. У *St. maltophilia* известен макроциклический лактамный противогрибковый антибиотик мальтофилин, неактивный в отношении бактерий [Jakobi et al., 1996]. Антимикробный спектр двух штаммов *St. maltophilia*, выделенных нами из плодовых тел грибов *Phaeolus schweinitzii* и *Polyporus squamosus*, по спектру антимикробной активности соответствует мальтофиллину, но тождественность с ним требует химического подтверждения. Вид *St. rhizophila* ассоциирован с растениями и проявляет противогрибковую активность, в том числе, в отношении фитопатогенных грибов [Wolf et al., 2002]. В настоящей работе *St. rhizophila* впервые выделен из плодового тела гриба и впервые установлена не только

противогрибковая, но и антибактериальная активность широкого спектра действия (таблица 13).

В ряде случаев бактериальные эндобионты являются микопатогенными агентами. Например, бактерия *Ew. americana* широко распространена в плодовых телах промышленно культивируемых видов грибов *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* и *Pleurotus ostreatus*. Показано, что *Ew. americana* является представителем нормальной микрофлоры здоровых плодовых тел базидиомицетов, однако у *Agaricus bisporus* бактерия *Ew. americana* может вызывать сердцевинный некроз шляпки [Inglis et al., 1996; Soler-Rivas et al., 1999; Reyes et al., 2004]. Помимо плодовых тел грибов *Ew. americana* встречается в растениях, животных, в клинических анализах больных, являясь оппортунистическим патогеном [Reyes et al., 2004]. Антимикробной активности у *Ew. americana* ранее описано не было. В настоящей работе у данной бактерии была выявлена антимикробная активность в отношении грамположительных бактерий, в том числе, в отношении метициллинрезистентного штамма *S. aureus* INA 00761 (MRSA), и грибов.

Бактерия *H. paralvei* широко распространена во внешней среде (в почве, воде), а также она известна как факультативный патоген, вызывающий поражения различных органов человека. Болезнетворным фактором является выделяемый токсин Шига, обладающий цитолитической активностью [Abbott et al., 2011]. Выделенный штамм *H. paralvei* INA 01141 проявляет антибиотическую активность в отношении грамположительных бактерий и грибов, ранее не описанную для данного вида.

Бактерии семейства *Micrococcaceae* встречаются во внешней среде повсеместно, в том числе, среди них описаны эндобионты растений. Известны антибиотики, образуемые *M. luteus* [Biskupiak et al., 1988] и *M. epidermidis* [Loeb et al., 1950]. В 2010 году из лесной почвы был выделен штамм, описанный как новый вид *M. terreus* sp. nov [Zhang et al., 2010]. Ранее не было известно об антибиотической активности бактерий *M. terreus*; представитель этого вида впервые был выделен как эндобионт базидиального гриба (*Lactarius rufus*), и впервые описана его антимикробная активность широкого спектра действия.

Антибиотик нокардин, обладающий противотуберкулезной активностью, описан в 1947 году у *N. coeliaca* [Emmart, 1947], однако после уточнения систематического положения продуцент был отнесен к близкому виду *N. autotrophica* [Gordon et al., 1974]. По нашим данным два штамма *N. coeliaca* – эндобионты плодового тела *Rusnaporus cinnabarinus* обладают антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий, химическая природа антибиотика нами не исследовалась (таблица 13).

Вид *Ach. spanius* описан в 2003 году [Coenye et al., 2003]. Штаммы данного вида были выделены из крови и ран больных. Бактерия поражает легкие и особенно опасна для больных муковисцидозом. В настоящей работе впервые описано выделение *Ach. spanius* из плодового тела гриба (*Mycena flavoalba*), а также впервые описана антибиотическая активность штамма данного вида, в том числе, в отношении тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853, устойчивого ко многим антибиотикам лекарственного назначения.

Заселение плодовых тел базидиомицетов бактериальными эндобионтами может происходить непосредственно при формировании плодового тела, либо эндобионты могут присутствовать в организме гриба на всех стадиях его развития, включая вегетативный мицелий. Было высказано предположение, что хитинолитическая активность бактерий-эндобионтов является основным фактором колонизации плодовых тел грибов, что подтверждает первое предположение, но также отмечено, что бактериальные эндобионты плодовых тел *Xerocomus* sp. и *Amanita muscaria* такой активностью не обладают [Dahm et al., 2005]. Анализ бактериальных сообществ, ассоциированных с микоризными базидиомицетами, показал, что бактерии связаны со спорами грибов и таким путем передаются от растения к растению [Agnolucci et al., 2015]. Можно предположить, что механизмы симбиотических связей грибов и бактерий на протяжении эволюции зависели от многих факторов и потому весьма разнообразны, в том числе, за счет образования антибиотиков.

Таким образом, следует отметить, что среди выделенных нами бактериальных эндобионтов плодовых тел базидиальных грибов выявлены виды

бактерий, ранее не выделявшиеся из подобного источника. К ним относятся штаммы *Ach. spanius*, *B. licheniformis*, *H. paralvei*, *M. terreus*, *N. coeliaca* и *St. rhizophila*. Среди исследованных штаммов обнаружены виды, у которых ранее не была описана антимикробная активность: *Ach. spanius*, *Ew. americana*, *H. paralvei*, *M. terreus*, *N. coeliaca*, *St. rhizophila*. Среди выделенных бактерий – эндобионтов плодовых тел грибов выявлен высокий процент (84,9%) штаммов – продуцентов антибиотиков, в том числе активных в отношении антибиотикорезистентных бактерий. Таким образом, плодовые тела базидиальных грибов можно рассматривать в качестве нетрадиционного перспективного источника бактерий-продуцентов антибиотиков. Антибиотики штаммов *B. subtilis* INA 01085 и INA 01086 исследовали химически (раздел 3.3.1).

3.3. Изучение наиболее перспективных штаммов бактерий – продуцентов антибиотиков

Одним из самых распространенных опасных патогенов, устойчивых к антибиотикам, в настоящее время является метициллинрезистентный золотистый стафилококк (MRSA). Последнее десятилетие для лечения заболеваний, вызванных MRSA, применяют гликопептидные антибиотики группы ванкомицина, однако стали все чаще фиксироваться патогенные бактерии, устойчивые также и к этой группе антибиотиков (VR). Учитывая это, нами были отобраны для химического изучения продуценты антибиотиков, активных одновременно в отношении тест-штаммов *S. aureus* INA 00761 (MRSA) и *L. mesenteroides* VKPM B-4177 (VR).

3.3.1. Штаммы *Bacillus subtilis* INA 01085 и INA 01086 – продуценты полиеновых и пептидных антибиотиков

Бактериальные штаммы INA 01085 и INA 01086 были выделены из плодового тела базидиомицета *Pholiota squarrosa* (OEDER) P.KUMM, 1871 (таблица

14) и представляли собой устойчивую контаминацию грибной культуры²⁰. При выделении в чистую культуру они хорошо росли на агаровой среде, формируя за сутки бежевые колонии, и выделяли в среду розоватый пигмент. Было показано, что обе бактерии палочковидны, размером 3x0,5 мкм, грамположительны. С первых по третьи сутки роста бактерии начинали образовывать эндоспоры, содержание которых к четвертым суткам было близко к 100%. Штамм INA 01085, в отличие от штамма INA 01086, образующего ровные гладкие колонии, растет в виде кожистых складчатых колоний (рисунок 11).

Для дальнейшего изучения штаммов амплифицировали и секвенировали ген 16S рРНК. Были получены последовательности длиной 1091 и 958 н.о. штаммов INA 01085 и INA 01086, которые были депонированы нами в GenBank под номерами KF311228 и KF311227, соответственно. Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что анализируемые последовательности ДНК на 100% совпадают с последовательностями штаммов *B. subtilis*. Затем последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями типовых штаммов ближайших видов бактерий из базы данных RDP. С помощью программы Mega 5.2.2 на основании типовых штаммов было построено дерево филогенетического родства (рисунок 12).

²⁰ Штамм *Pholiota squarrosa* 3203 взят в культуру О.В. Ефременковой и И.Г. Сумаруковой. Штаммы INA 01085 и INA 01086 как устойчивые контаминанты штамма 3203 выделены в культуру И.А. Маланичевой.

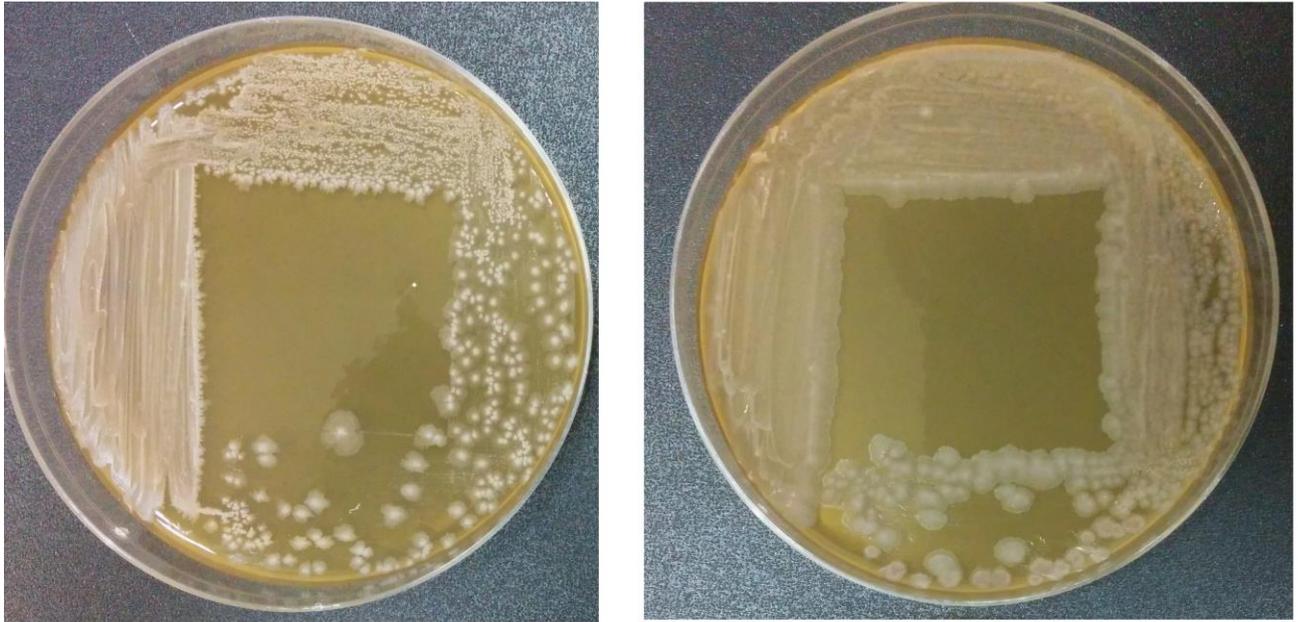


Рисунок 11. Поверхностный рост штаммов INA 01085 (слева) и INA 01086 (справа).

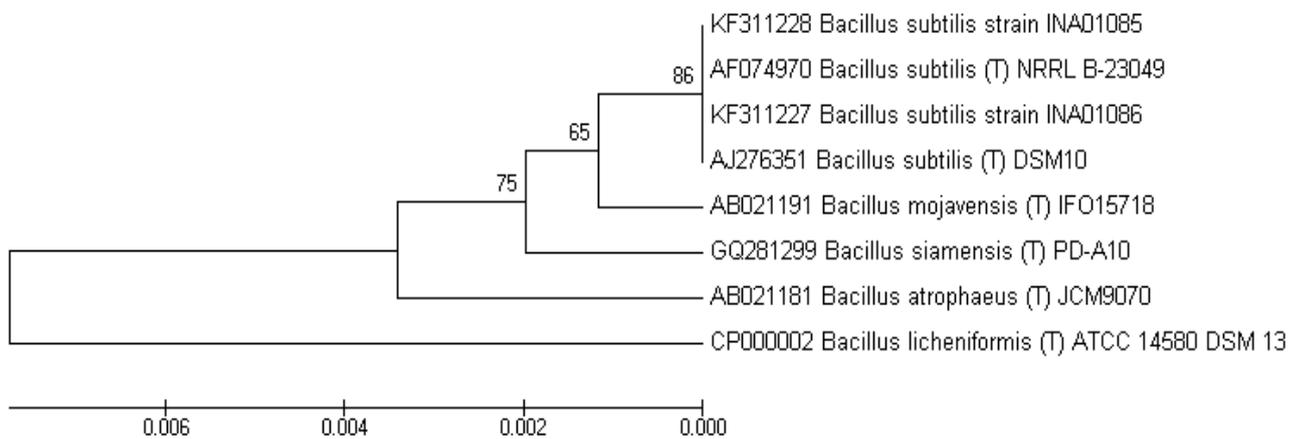


Рисунок 12. Дерево филогенетического родства и положение штаммов INA 01085 и INA 01086 на основании последовательности гена 16S рРНК. Масштаб показывает эволюционные расстояния, соответствующие 2 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. Цифрами обозначена достоверность ветвления, установленная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

Оба штамма имеют широкий спектр антибактериальной активности, а также активны в отношении тест-штаммов грибов (таблица 13). Было установлено, что культуральная жидкость обоих штаммов содержит антимикробные вещества, активные в отношении всех применявшихся грамположительных тест-бактерий, а также в отношении *E. coli* ATCC 25922, причем наивысший уровень активности был зарегистрирован в первые четверо суток культивирования. Штамм INA 01085 также проявлял на низком уровне противогрибковую активность в отношении *A. niger* INA 00760 и *Sac. cerevisiae* RIA 259, а штамм INA 01086 – только следы противогрибковой активности в отношении *A. niger* INA 00760. Оба штамма неактивны в отношении тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853. На рисунках 13а и 13б показана динамика накопления в культуральной жидкости веществ, активных в отношении тест-бактерий, устойчивых к антибиотикам, используемым в медицинской практике (в отношении штамма *S. aureus* INA 00761 (MRSA) и штамма *L. mesenteroides* VKPM B-4177 (VR), а также в отношении кишечной палочки (*E. coli* ATCC 25922)).

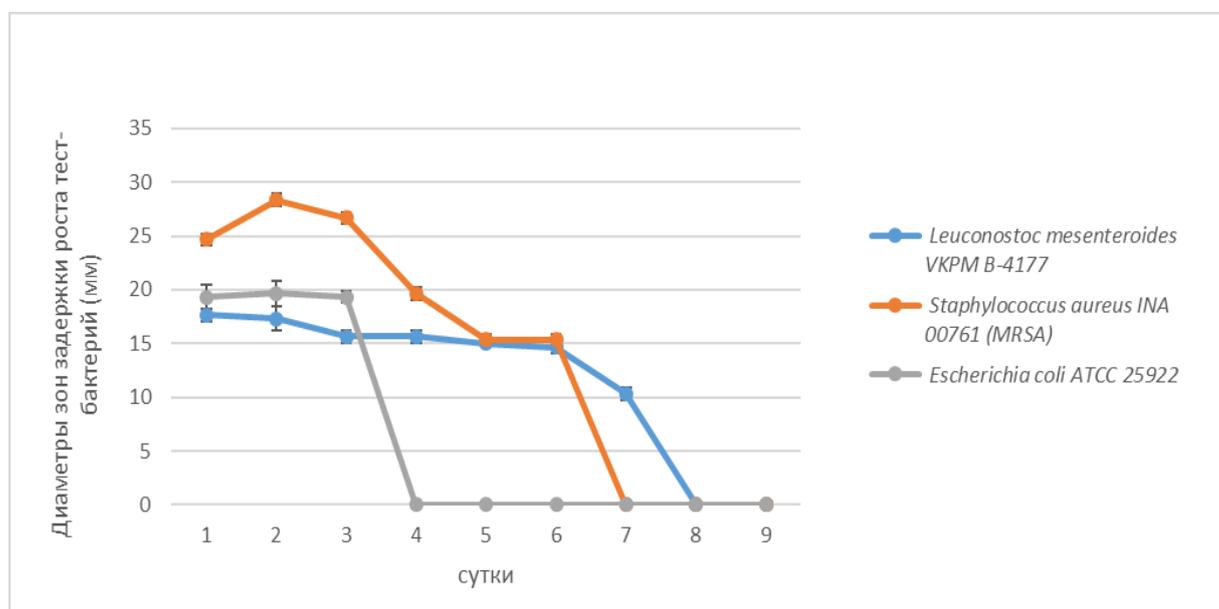


Рисунок 13а.

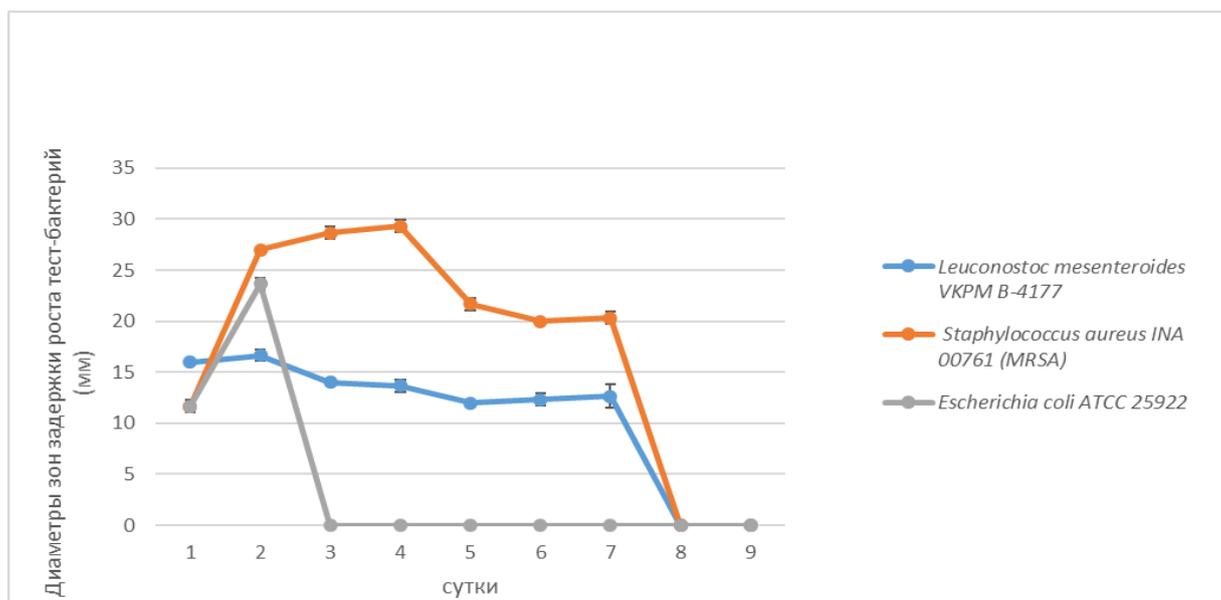


Рисунок 13б.

Рисунок 13. Проявление антимикробной активности в культуральной жидкости штаммов *B. subtilis* INA 01085 (рис. 13а) и INA 01086 (рис. 13б) в зависимости от длительности культивирования. Представлены диаметры зон задержки роста (в мм) тест-бактерий *S. aureus* INA 00761 (MRSA), *L. mesenteroides* VKPM B-4177, *E. coli* ATCC 25922.

Изучение химической природы антибиотиков проводилось в Лаборатории химического изучения биологически активных соединений микробного происхождения ФГБНУ «НИИНА» при нашем участии. Совместно со с.н.с. В.А. Зенковой в культуральной жидкости обоих штаммов было обнаружено по два антибиотика разной химической природы. При выделении и очистке на колонке, заполненной силикагелем Kieselgel 60, в первых фракциях, элюированных этилацетатом, содержались полиеновые антибиотики. На основании UV-VIS-спектрофотометрического анализа было установлено, что штамм INA 01085 образует гексаен с поглощением λ_{\max} (60% этанол) = 340, 362 и 385 нм, а штамм INA 01086 образует пентаен с поглощением λ_{\max} (60% этанол) = 319, 336 и 355 нм. Очищенные сырцы обоих антибиотиков проявляли активность в отношении грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 и *S. aureus* INA 00761

(MRSA), а также в отношении *A. niger* INA 00760 и *Sac. cerevisiae* RIA 259, но были неактивны в отношении штамма *E. coli* ATCC 25922.

Кроме того, было выделено два антибиотика пептидной природы, физико-химические свойства которых представлены в таблице 17.

Таблица 17. Физико-химические свойства пептидных антибиотиков, образуемых штаммами *B. subtilis* INA 01085 и INA 01086.

Свойства	Антибиотик штамма INA 01085	Антибиотик штамма INA 01086
Молекулярная масса (Да)	2059	1505
UV-VIS спектр (60% этанол), λ _{max} , нм	203; 270-280;	202; 224; 278-282;
ТСХ (SiO ₂ , Merck, F254), Rf в системах: 1) метанол 2) этилацетат-этанол-вода (40:15:15)	0,70 0,9	0,74 0,76
Качественные реакции: 1) KMnO ₄ 2) реактив Паули 3) реактив Эрлиха 4) 0,5% нингидрин в этаноле	- + + -	- + + -
Растворимость: 1) хорошая 2) плохая	Метанол, 60% этанол Вода, ацетон, гексан	Метанол, 60% этанол Вода, ацетон, гексан
Аминокислотный состав	Asp, Gly, Leu, Pro, Tyr, Thr, Trp, Phe, 2 неидентифицированные небелковые аминокислоты	Asp, Gly, Leu, Pro, Tyr, Thr, Trp, Phe
Чувствительные микроорганизмы	Грамположительные бактерии	Грамположительные бактерии

Таким образом, оба пептидных антибиотика обладают узким антимикробным спектром: они активны в отношении всех применявшихся

грамположительных тест-бактерий, но не активны в отношении грамотрицательных бактерий и грибов. Полиеновые антибиотики, а именно пентаен штамма INA 01086 и гексаен штамма INA 01085, активны в отношении тест-штаммов грамположительных бактерий и грибов. Поскольку у культуральной жидкости в ранние сроки культивирования была установлена активность в отношении грамотрицательной тест-бактерии *E. coli* ATCC 25922, а выделенные антибиотики такой активностью не обладают, можно предположить, что оба штамма дополнительно образуют третий антибиотик. По-видимому, он образуется в незначительном количестве, либо легко разрушается, либо при данной схеме выделения и очистки, основанной на контроле биологической активности в отношении *S. aureus* INA 00761 (MRSA), не проявляет активности и поэтому не был выделен.

Известно, что среди бацилл вид *B. subtilis* занимает первое место по числу описанных антибиотиков различной химической природы, в том числе пептидов, различающихся по химическим свойствам, механизму биосинтеза и по спектрам антимикробного действия. С практической точки зрения антибиотики *B. subtilis* могут иметь разное применение, в том числе в качестве лекарственных средств. До сих пор применяется в медицине пептидный антибиотик бацитрацин – один из первых антибиотиков, описанный в 1945 году и образуемый выделенным из раны человека штаммом *B. subtilis* [Johnson et. al., 1945]. В настоящее время известен ряд близких антибиотиков, образующих бацитрациновый комплекс [Ikaï et. al., 1992]. Бацитрацин, обладающий слабо выраженной токсичностью, в 2010 году был разрешен в США для лечения стафилококковых инфекций у новорожденных [Fickers, 2012]. Сочетание бацитрацина с неомицином эффективно в отношении большинства клинических изолятов устойчивого стафилококка (MRSA), что весьма важно для современной антимикробной терапии [Suzuki et. al., 2011].

Описанные нами антибиотики штаммов INA 01085 и INA 01086, по аминокислотному составу отличаются от описанных в литературе пептидных антибиотиков и, соответственно, относятся к ранее неизвестным природным соединениям. Важным свойством этих антибиотиков является их активность в

отношении бактерий, устойчивых к антибиотикам бета-лактамной и гликопептидной природы.

3.3.2. Штамм *Bacillus pumilus* INA 01087 – продуцент антибиотиков группы амикумацина

Среди штаммов, выделенных из почвы Краснодарского края, для дальнейшего исследования нами был отобран штамм INA 01087, культуральная жидкость которого проявляет на высоком уровне антимикробную активность в отношении *S. aureus* INA 00761 и *L. mesenteroides* VKPM B-4177, начиная с 24 часов до 7 суток культивирования.

Морфологическое исследование показало, что клетки штамма INA 01087 грамположительны, палочковидны, размером 1×(3-4) мкм, на вторые сутки культивирования на агаровой среде формируют характерные для бацилл эндоспоры, содержание которых на 11 сутки близко к 100%. Штамм формирует круглые бежевые блестящие колонии с ровным краем, экзопигмент отсутствует.

Для дальнейшего изучения амплифицировали и секвенировали ген 16S рРНК. Была проанализирована последовательность гена длиной 1503 н.о. и депонирована в GenBank под номером KF717600. Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что анализируемая последовательность ДНК на 100% идентична с последовательностями штаммов *B. pumilus*. Последовательность была выровнена с соответствующими последовательностями типовых штаммов ближайших видов бактерий из базы данных RDP. С помощью программы Mega 5.2.2 на основе типовых штаммов было построено дерево филогенетического родства (рисунок 14).

На основании морфологических и генетических данных штамм был отнесен к виду *B. pumilus* и депонирован в Коллекцию культур микроорганизмов Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе под номером INA 01087.

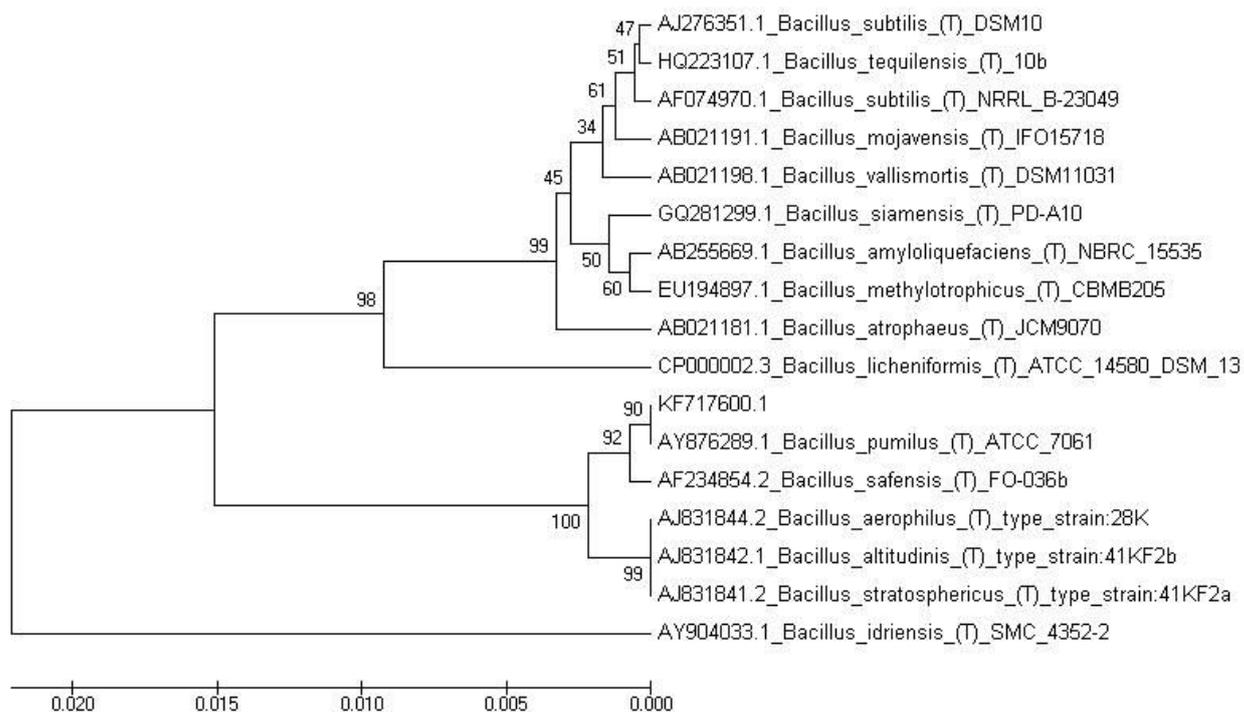


Рисунок 14. Филогенетическое положение штамма *Bacillus pumilus* INA 01087 на основе последовательности гена 16S рНК (последовательность гена депонирована в GenBank под номером KF17600.1). Масштаб – 5 нуклеотидных замен на 1000 нуклеотидов. Цифры – достоверность ветвления по “bootstrap”-анализу 100 альтернативных деревьев.

При исследовании антибиотикообразования штаммом INA 01087 было установлено, что культуральная жидкость содержит антимикробные вещества, активные в отношении почти всех применявшихся грамположительных тест-бактерий, кроме штамма *B. pumilus* NCTC 8241, в отношении кишечной палочки и грибов.

Наивысший уровень активности в отношении антибиотикорезистентных тест-бактерий *S. aureus* INA 00761 (MRSA) и *L. mesenteroides* VKPM B-4177 (VR) наблюдали на вторые сутки культивирования. На рисунке 15 показана динамика накопления в культуральной жидкости веществ, активных в отношении антибиотикорезистентных тест-бактерий, а также в отношении кишечной палочки (*E. coli* ATCC 25922).

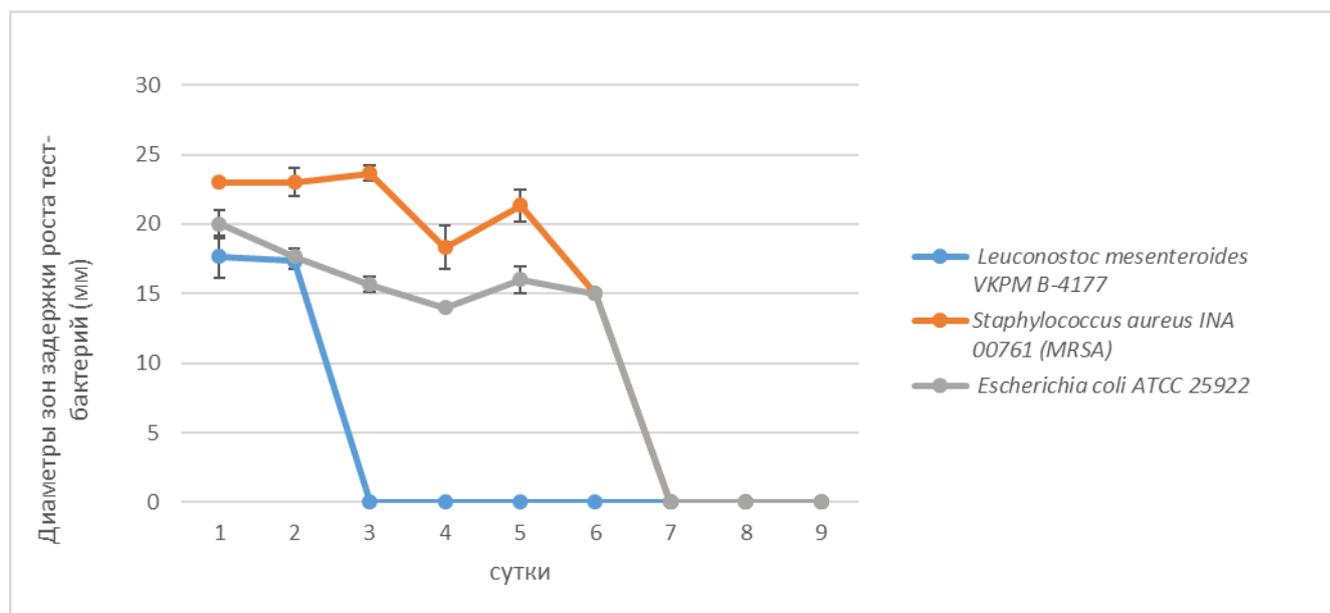


Рисунок 15. Проявление антимикробной активности в культуральной жидкости штамма *B. pumilus* INA 01087 в зависимости от длительности культивирования. Представлены диаметры зон задержки роста (в мм) тест-бактерий: *S. aureus* INA 00761 (MRSA), *L. mesenteroides* VKPM B-4177, *E. coli* ATCC 25922.

Выделение и установление структуры антибиотиков проводилось сотрудниками Лаборатории химического изучения биологически активных соединений микробного происхождения (зав. лаб., д.х.н. В.А. Коршун, с.н.с., к.х.н. В.А. Зенкова, н.с., к.х.н. Е.А. Рогожин) и Лаборатории химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА» (г.н.с., д.х.н. А.М. Королев). Работа диссертанта заключалась в накоплении культуральной жидкости для химического изучения и анализа антибиотической активности на всех этапах выделения и очистки. Анализ продуктов биосинтеза штамма *B. pumilus* INA 01087 показал наличие трех антибиотических веществ, из которых преобладало вещество, идентифицированное с амикумацином А, и обладающие активностью в отношении как *S. aureus* INA 00761, так и *L. mesenteroides* VKPM B-4177, но не в отношении грамотрицательных бактерий и грибов.

Выделение и очистка антибиотика с последующим анализом показали наличие ранее описанных антибиотиков – амикумацинов А и В (рисунок 16).

Нами были определены величины МПК в отношении коллекционных тест-штаммов, в том числе клинического изолята MRSA, многие из которых обладают множественной устойчивостью к антибиотикам (таблица 18). Из таблицы следует, что амикумацин А активен в отношении ряда грамположительных бактерий, например, в отношении штаммов стафилококков (МПК 0,5 мкг/диск), лейконостока (МПК 0,5 мкг/диск), а также одного из двух тест-штаммов *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 (МПК 2 мкг/диск).

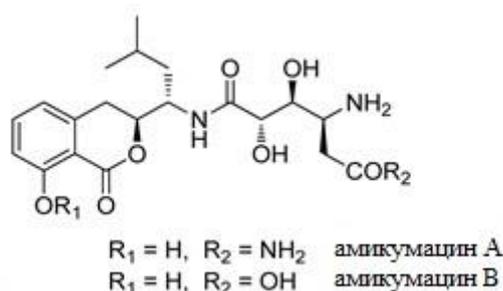


Рисунок 16. Структуры антибиотиков амикумацинов А и В, выделенных из культуральной жидкости штамма *Bacillus pumilus* INA 01087.

Таблица 18. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) амикумацина А (мкг/диск), проявленная в отношении коллекционных тест-штаммов.

Тест-штаммы	МПК амикумацина А
<i>S. aureus</i> INA 00761 (MRSA) [■] ■*	0,5
<i>S. aureus</i> FDA 209P (MSSA) [■]	0,5
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 (=RIA 445)	>32
<i>B. mycoides</i> 537	>32
<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	>32
<i>M. luteus</i> NCTC 8340	2
<i>L. mesenteroides</i> VKPM B-4177 [■] ■	0,5
<i>Mycobacterium smegmatis</i> VKPM Ac 1339	>16
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	2,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>32
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>32
<i>C. terrigena</i> VKPM B-7571 (=ATCC 8461)	>32
<i>Sac. cerevisiae</i> RIA 259	>32

Продолжение таблицы 18.

Тест-штаммы	МПК амикумацина А
<i>A. niger</i> INA 00760	>32
<i>Fusarium oxysporum</i> VKPM F 140	>32
<i>Trichoderma viride</i> INA 01111	>32

Примечание: ■ МПК оксациллина 1 мкг/диск; ■■ МПК оксациллина 32 мкг/диск; ■■■ МПК ванкомицина >256 мкг/диск; * клинический изолят.

Продуктивность штамма INA 01087 колебалась и составляла от 28 до 42 мкг/мл амикумацина А на питательной среде, содержащей глюкозу (1%), пептон (0,5%), триптон (0,3%), NaCl (0,5%). Для повышения продуктивности проводили ступенчатую селекцию штамма INA 01087 без применения мутагенных факторов. В результате четырех ступеней селекции из популяции был отобран наиболее продуктивный вариант данного штамма. Отбор проводили по биологической активности в отношении тест-бактерии *S. aureus* INA 00761 (MRSA). При глубинном культивировании на данной среде в равных условиях отобранный вариант отличается от исходного штамма INA 01087 по уровню биосинтеза антибиотика, образуя от 80 до 110 мкг/мл амикумацина А. Полученный селекционный вариант отличается также по морфологическим признакам. При равной плотности высева исходного штамма и селекционного варианта на агаризованную среду отобранный вариант отличается более крупным размером колоний и клеток (1,2×4,2 мкм). Установлено, что ген 16S рРНК селекционного варианта идентичен гену исходного штамма *B. pumilus* INA 01087. Прошедший селекцию вариант депонирован в Коллекцию культур микроорганизмов ФГБНУ «НИИНА» под номером INA 01110 и в Коллекцию ВКПМ под номером VKPM В-12548. На рисунках 17-18 представлены хроматограммы ВЭЖХ продуктов биосинтеза штаммов *B. pumilus* INA 01087 и INA 01110.

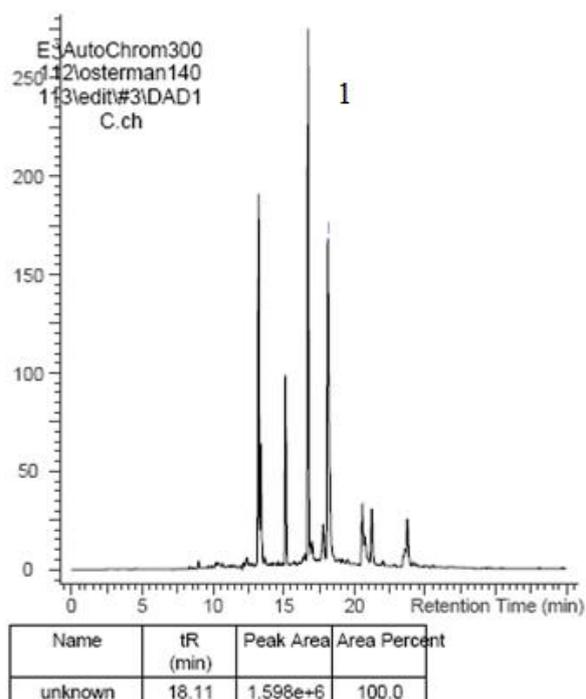


Рисунок 17. Анализ методом ВЭЖХ продуктов биосинтеза штамма *Bacillus pumilus* INA 01087. Пик с выходом 18,11 мин соответствует амикумацину А.

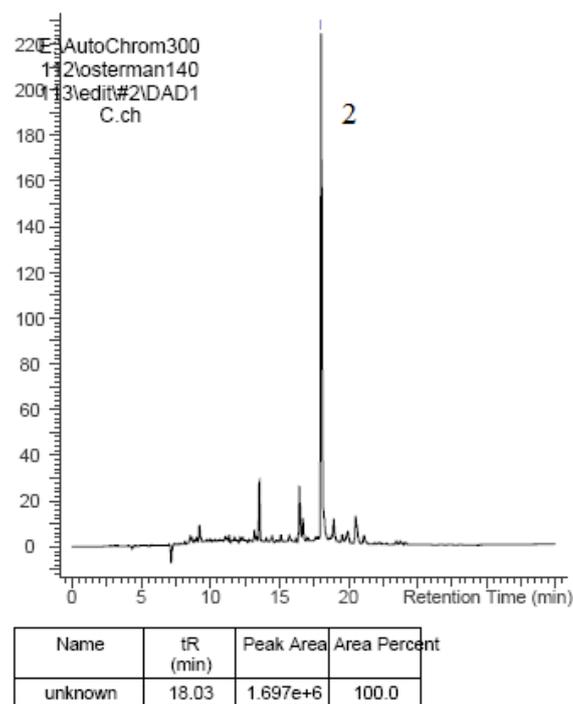


Рисунок 18. Анализ методом ВЭЖХ продуктов биосинтеза штамма *Bacillus pumilus* INA 01110. Пик с выходом 18,031 мин соответствует амикумацину А.

В 1981 году группа исследователей сообщила о новом семействе антибиотиков – амикумацины А-С, продуцентом которых являлся *B. pumilus* [Itoh et al., 1981; Itoh et al., 1982a; Itoh et al., 1982b]. Однако, при этом авторы особое внимание уделяли не антибактериальным свойствам веществ, а их способности купировать отеки конечностей и язву желудка у мышей. Амикумацины относят к соединениям группы 3,4-дигидроизокумарина, высокоактивным антибиотикам, обладающим антибактериальными, противовоспалительными, противоязвенными (гастропротекторными), гербицидными и цитотоксическими свойствами. Продуцентами дигидроизокумаринов, в основном, являются бактерии (*Bacillus* spp., *Actinobacteria* и *Gamma*proteobacteria) и растения. Штаммы *Bacillus* spp. –

продуценты амикумацинов – были выделены из морской воды, морских отложений, грибов – симбионтов морских водорослей, почвы, от человека и животных, кормов для животных и муки. Дигидроизокумарины обладают активностью *in vitro* в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Наиболее изученным и активным соединением группы дигидроизокумаринов является амикумацин А, также проявляющий активность в отношении патогенных бактерий, вызывающих опасные заболевания: *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Shigella flexneri* [Pinchuk et al., 2001], *Vibrio metschnikovii* [Shimojima et al., 1982], *P. aeruginosa* [Li et al., 2012], *Chromobacterium violaceum* [Li et al., 2012], *Strep. pyogenes*, *B. anthracis* и *B. cereus* [Lama et al., 2012]. В 2012 году также была опубликована информация об эффективности этого антибиотика в отношении штаммов MRSA и VISA [Lama et al., 2012]. Была показана высокая активность амикумацина А в отношении *Candida albicans*, вызывающего кандидомикозы у людей [Tyurin et al., 2017]. В связи с нарастающей проблемой резистентности актуальны дальнейшие исследования амикумацина А и подобных соединений.

Нами показано, что амикумацин А активен в отношении MRSA и штамма *L. mesenteroides* VKPM В-4177 (VR) при малой величине МПК (0,5 мкг/диск). Кроме того, впервые показано антибиотическое действие на тест-штамм *Muc. smegmatis* mc² 155. В 2016 году сотрудниками ФГБНУ «НИИНА» и ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России установлена активность амикумацина А в отношении патогенных грибов *Candida krusei* 247 и *Cryptococcus neoformans* 245 с множественной лекарственной устойчивостью [Ефременкова с соавт., 2017]. По данным П.В. Сергиева с сотрудниками при нашем участии было показано, что амикумацин А имеет ранее неописанный сайт связывания с рибосомой, что объясняет его активность в отношении устойчивых вариантов тест-микроорганизмов [Polikanov et al., 2014]. На основании полученных результатов амикумацин А рассматривается в качестве перспективного соединения в плане изыскания новых эффективных медицинских антибиотиков, поэтому работа с ним в ФГБНУ «НИИНА» продолжается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неэффективность антибиотиков в лечении инфекционных заболеваний является одной из важнейших проблем современного мира. По примерным подсчетам ежегодно умирает 700 тысяч человек от инфекций, вызванных антибиотикорезистентными патогенными бактериями, а к 2050 году это число может увеличиться до 10 млн человек [O'Neill, 2016]. Одним из способов решения данной проблемы является изыскание новых эффективных природных антибиотиков. В настоящее время исследования направлены как на поиск продуцентов новых антибиотиков, так и на изучение ранее неисследованной антимикробной активности «старых новых» антибиотиков или улучшение их свойств. Основными продуцентами антибиотиков на протяжении десятилетий были почвенные актинобактерии, но в настоящее время поиск продуцентов расширяется, изучаются малоисследованные виды или виды, выделенные из ранее неисследованных источников. Данное исследование посвящено поиску продуцентов новых антибиотиков, активных в отношении микроорганизмов с лекарственной устойчивостью, среди бактерий, выделенных из образцов выщелоченного чернозема Краснодарского края, многолетнемерзлой почвы Антарктики и плодовых тел базидиальных грибов, собранных в Москве и Московской области. Из этих источников было выделено в общей сложности 329 штаммов бактерий, из которых антибиотическая активность была выявлена у 103. При этом было обнаружено, что наибольшей способностью к образованию антибиотических веществ обладают штаммы, выделенные из плодовых тел базидиальных грибов (84,9%). Процент бактерий - продуцентов антибиотиков, выделенных из многолетнемерзлой почвы Антарктики, также был достаточно высок и составил 40,6%. Почва Краснодарского края оказалась наименее перспективным источником бактерий, образующих антибиотики: из 204 выделенных штаммов только 11 (5,4%) синтезировали соединения, проявляющие антимикробную активность. Тем не менее, анализ результатов изучения антимикробной активности выделенных продуцентов антибиотиков показал, что

каждый источник содержит бактерии, обладающие активностью в отношении антибиотикорезистентных тест-штаммов. Так, бактериальный штамм INA 01168, выделенный из почвы Краснодарского края, проявил антибиотическое действие в отношении штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853, обладающего множественной лекарственной устойчивостью, и *L. mesenteroides* VKPM В-4177. Высоким уровнем активности в отношении штамма *S. aureus* INA 00761 (MRSA) обладают штаммы INA 01087, INA 01169 – INA 01172, среди которых для дальнейшего химического изучения был отобран штамм INA 01087, обладающий также высоким уровнем антимикробной активности в отношении антибиотикорезистентного штамма *L. mesenteroides* VKPM В-4177.

Углубленные исследования штамма *B. pumilus* INA 01087 показали, что он образует ранее описанный антибиотик амикумацин А, интерес к которому в настоящее время вызван тем, что он проявляет активность в отношении бактерий с устойчивостью типа MRSA и VR. Нами впервые показано, что амикумацин А активен в отношении тест-штамма *Myc. smegmatis* mc² 155. Таким образом, амикумацин А является примером «старых новых антибиотиков», обладающим активностью в отношении широкого спектра тест-организмов, в том числе патогенов с множественной лекарственной устойчивостью.

Среди исследованных бактериальных продуцентов антибиотиков, выделенных из многолетнемерзлой почвы Антарктики, наибольшей активностью в отношении штамма *L. mesenteroides* VKPM В-4177 обладали 18,8% штаммов. По нашим результатам, сопоставленным с литературными данными, у представителей видов *B. mojavensis* и *B. licheniformis* впервые описана такая активность, а у штамма *B. safensis* впервые показана активность в отношении тест-штаммов, обладающих лекарственной устойчивостью: *S. aureus* INA 00761 (MRSA), *L. mesenteroides* VKPM В-4177 (VR), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MDR).

Исследование плодовых тел базидиальных грибов (базидиом) Москвы и Московской области показало, что из 93 бактериальных эндобионтов 79 обладают антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов. Виды *Ach. spanius*, *B. licheniformis*,

H. paralvei, *M. terreus*, *N. coeliaca*, *St. rhizophila* впервые выделены из плодовых тел высших грибов, а у представителей видов *Ach. spanius*, *Ew. americana*, *H. paralvei*, *M. terreus*, *N. coeliaca* и *St. rhizophila* впервые описана антибиотическая активность. Среди исследованных бактерий – эндобионтов грибов отобрано два штамма *B. subtilis*, выделенных из одного плодового тела базидиального гриба *Pholiota squarrosa* (OEDER) P.KUMM, 1871. При химическом исследовании культуральной жидкости было установлено, что они образуют ранее неописанные пептидные антибиотики, сходные по аминокислотному составу и активные в отношении MRSA и VR. Поскольку вид *B. subtilis* является космополитом и встречается на самых разных субстратах, ему свойственна широкая приспособляемость к разным условиям среды, что, в частности, выражается в большом разнообразии образуемых антибиотиков. Оба штамма-продуцента выделены из одного источника – плодового тела базидиального гриба, и имеют схожий аминокислотный состав, что дополнительно свидетельствует о большом биосинтетическом потенциале данного вида, его вариабельности и о том, что в последующих исследованиях следует ожидать дальнейшего описания новых антибиотиков у штаммов *B. subtilis* и близкородственных видов.

Исследованные штаммы – продуценты антибиотиков, активных в отношении антибиотикорезистентных бактерий, и штаммы тех видов, у которых ранее не было описано образование антибиотиков, лиофилизированы и заложены на длительное хранение в Коллекцию культур микроорганизмов ФГБНУ «НИИНА» и в Коллекцию продуцентов антибиотиков Сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий, ФГБНУ «НИИНА». Созданная коллекция является основой для дальнейшей работы по созданию новых антибиотиков медицинского назначения, преодолевающих антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. Подобрана тест-система для отбора продуцентов антибиотиков, основанная на использовании коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов (грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов) с различным уровнем антибиотикорезистентности.

2. Изучена антибиотическая активность 329 штаммов бактерий, выделенных из почвы Краснодарского края (204 штамма), плодовых тел базидиальных грибов Москвы и Московской области (93 штамма) и многолетнемерзлой почвы Антарктики (32 штамма). Из всех трех экосистем выделены бактериальные продуценты антибиотиков, обладающих активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных антибиотикорезистентных штаммов.

3. Среди изученных экосистем наиболее перспективным источником продуцентов антибиотиков являются плодовые тела базидиальных грибов – процент антибиотически активных штаммов составляет 84,9.

4. Впервые установлено, что представители видов *B. mojavensis*, *B. licheniformis* и *B. safensis*, выделенных из многолетнемерзлой почвы Антарктики, продуцируют антибиотики, активные в отношении антибиотикорезистентных штаммов.

5. Впервые из плодовых тел грибов выделены бактериальные эндобионты видов *Ach. spanius*, *B. licheniformis*, *H. paralvei*, *M. terreus*, *N. coeliaca*, *St. rhizophila*.

6. Впервые установлено наличие антибиотической активности у представителей видов *Ach. spanius*, *Ew. americana*, *H. paralvei*, *M. terreus*, *N. coeliaca* и *St. rhizophila*.

7. Впервые установлено, что эндобионтные штаммы *B. subtilis* (INA 01085 и INA 01086), выделенные из одного плодового тела *Pholiota squarrosa*, продуцируют новые антибиотики пептидной природы, активные в отношении

всех применявшихся грамположительных тест-бактерий, и полиеновые антибиотики, активные в отношении грамположительных бактерий и грибов.

8. Получен и запатентован штамм *B. pumilus* INA 01110 – продуцент антибиотика амикумацина А, продуктивность которого на 162% превышает уровень биосинтеза исходного штамма. Показана активность амикумацина А в отношении тест-штаммов MRSA, VR и *Myc. smegmatis* mc² 155.

9. Выделен и охарактеризован 31 новый штамм - продуцент антибиотиков, преодолевающих антибиотикорезистентность микроорганизмов. Все штаммы депонированы в Коллекцию культур микроорганизмов ФГБНУ «НИИНА».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений: учеб. пособие для студентов спец. «Биология» / Под ред. Штерншис М.В., Беляев А.А., Цветкова В.П., Шпатова Т.В. – Новосибирск: изд-во Сибирского отделения РАН, 2016. – 284 с.
2. Гарибова Л.В., Сидорова И.И. Грибы. Энциклопедия природы России. – М.: АБФ, 1999. – 352 с.
3. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.Л., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. – 245 с.
4. Грузина В.Д. Индукция роста, образования антибиотиков и морфологической дифференцировки при межвидовых взаимодействиях бактерий: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук: 03.00.23 / Грузина Виктория Дмитриевна; ГУ НИИ по изыск. новых антибиот. РАМН. – М., 2003. – 110 с.
5. Грюнерт Г., Грюнерт Р. Грибы / пер. с нем. И. Шаталова. – М.: Астрель, 2002. – 288с.
6. Дудка И.А., Вассер С.П. Грибы. Справочник миколога и грибника. – Киев: Наукова думка, 1987. – 536 с.
7. Дудник Ю.В. Перспективы создания препаратов, активных в отношении устойчивых форм бактерий // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – Т. 44, № 12. – С. 15–18.
8. Егоров Е.С., Баранова И. П. Бактериоцины. Образование свойства, применение // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – Т. 44, № 1. – С. 33–40.
9. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках // М.: Наука, 2004. – 528 с.
10. Ефременкова О.В., Габриэлян Н. И., Маланичева И.А., Ефименко Т.А., Сумарукова И.Г., Глухова А.А., Бойкова Ю.В., Рогожин Е.А., Королев А.М., Коршун В.А., Дробкина И.В. Антимикробные свойства амикумацина А // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т. 62, № 1-2. – С. 16–19.
11. Загрядская Ю.А., Лысак Л.В., Сидорова И.И., Александрова А.В., Воронина Е.Ю. Бактериальные комплексы плодовых тел и гифосферы некоторых

базидиомицетов // Известия РАН. Серия биологическая. – 2013. – № 4. – С. 405–411.

12. Загрядская Ю.А. Влияние базидиальных грибов лесных биотопов на почвенные бактериальные сообщества: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.02.03) / Загрядская Юлия Александровна; ф-т почвовед. МГУ им. М.В. Ломоносова. – Москва, 2014. – 148с.

13. Загрядская Ю.А., Лысак Л.В., Сидорова И.И., Александрова А.В. Бактериальные сообщества локусов, формируемых базидиомицетами в лесном биоценозе // Современная микология в России. Материалы III международного микологического форума / Ред.: Ю.Т. Дьяков, Ю.В. Сергеев. М.: Нац. акад. микологии. – 2015. – Т. 5. – С. 407–409.

14. Катруха Г.С., Зарубина А.П., Юдина Т.П., Фёдорова Г.Б., Новоселова Л.А. Антибиотики штамма *Photorhabdus luminescens* ZMI — симбионта энтомопатогенных нематод // Антибиотики и химиотерапия. – 2009. – Т. 54, №11-12. – С. 11–16.

15. Козлов Р.С., Дехнич А.В. Цефдиторен пивоксил: клинико-фармакологическая и микробиологическая характеристика // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16, № 2. – С. 111–129.

16. Козлов С.Н., Страчунский Л. С. Современная антимикробная химиотерапия. М.: Медицинское информационное агентство, 2009. – 448 с.

17. Лессо Т. Грибы: Определитель / пер. с англ. Л. В. Гарибовой, С. Н. Лекомцевой. – М.: Астрель, 2003. – 304 с.

18. Навашин С.М. Отечественному пенициллину 50 лет: история и прогнозы // Антибиотики и химиотерапия. – 1994. – Т. 39, № 1. – С. 3–10.

19. Определитель грибов России. Бондарцева М.А. / под ред. Коваленко А.Е., Бот. институт им. В.Л. Комарова, Научный совет по проблемам ботаники РАН. – СПб.: Наука, 1998. – 391 с.

20. Петрова М.А., Горленко Ж.М., Соина В.С., Миндлин С.З. Изучение ассоциации генов *strA-strB* с плазмидами и транспозонами у современных и древних штаммов бактерий // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 9. – С. 1281–1286.
21. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М.: Издательство РАМН, 2000. – С. 11–16.
22. Практическое руководство по антиинфекционной терапии: Рук. для врачей / Под ред. Страчунского Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. – Смоленск: МАКМАХ, 2007. – 464 с.
23. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // Успехи биологической химии. – 2004. – Т. 44. – С. 263–306.
24. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas* / Под ред. Б. Е. Айзенман. – Киев: Наукова думка, 1990. – 264 с.
25. Стоянова Л. Г., Устюгова Е. А., Нетрусов А. И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48, № 3. – С. 259–275.
26. 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.
27. Abbott S.L., Moler S., Green N., Tran R.K., Wainwright K., Janda J.M. Clinical and Laboratory Diagnostic Characteristics and Cytotoxigenic Potential of *Hafnia alvei* and *Hafnia paralvei* Strains // J Clin Microbiol. – 2011. – V. 49, № 9. – P. 3122–3126.
28. Abriouel H., Franz C.M.A.P., Ben Omar N., Galvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins // FEMS Microbiol Rev. – 2011. – V. 35. – P. 201–232.
29. Ageitos J.M., Sánchez-Pérez A., Calo-Mata P., Villa T.G. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria // Biochem. Pharmacol. – 2017. – V. 133, – P. 117–138.

30. Agnolucci M., Battini F., Cristani C., Giovannetti M. Diverse bacterial communities are recruited on spores of different arbuscular mycorrhizal fungal isolates // *Biol. Fertil. Soils.* – 2015. – V. 51, № 3. – P. 379–389.
31. Alvarez-Ordóñez A., Begley M., Clifford T., Deasy T., Considine K., O'Connor P., Ross R.P., Hill C. Investigation of the Antimicrobial Activity of *Bacillus licheniformis* Strains Isolated from Retail Powdered Infant Milk Formulae // *Probiotics Antimicrob Proteins.* – 2014. – V. 6, № 1. – P. 32–40.
32. Arenskötter M., Bröker D., Steinbüchel A. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 70, № 6. – P. 3195–3204.
33. Baltz R.H. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2008. – V. 8. – P. 557–563.
34. Banskota A.H., Mcalpine J.B., Sørensen D., Ibrahim A., Aouidate M., Pirae M., Alarco A.M., Farnet C.M., Zazopoulos E. Genomic analyses lead to novel secondary metabolites. Part 3. Eco-0501, a novel antibacterial of a new class // *J. Antibiot.* – 2006. – V. 59. – P. 533–542.
35. Barbosa J., Caetano T., Mendo S. Class I and Class II Lanthipeptides Produced by *Bacillus* spp. // *J. Nat. Prod.* – 2015. – V. 78, № 11. – P. 2850–2866.
36. Baruzzi F., Quintieri L., Morea M., Caputo L. Antimicrobial Compounds Produced by *Bacillus* spp. and Applications in Food. In: Vilas A.M. (ed.). *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances.* // Formatex, Badajoz, Spain, 2011. – P. 1102-1111.
37. Bérdy J. Bioactive microbial metabolites // *J. Antibiot.* – 2005. – V. 58, № 1. – P. 1–26.
38. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading // *J. Antibiot.* – 2012. – V. 65. – P. 385–395.
39. Bibi F., Faheem M., Azhar E.I., Yasir M., Alvi S.A., Kamal M.A., Ullah I., Nasser M.I. Bacteria from marine sponges: A source of new drugs // *Curr. Drug Metab.* – 2016. – V. 17. – P. 1–6.

40. Biskupiak J.E., Meyers E., Gillum A.M., Dean L., Trejo W.H., Kirsch D.R. Neoberninamycin, a new antibiotic produced by *Micrococcus luteus* // J. Antibiot. – 1988. – V. 41, № 5. – P. 684–687.
41. Blaschke A.J., Bender J., Byington C.L., Korgenski K., Daly J., Petti C.A., Pavia A.T., Ampofo K. *Gordonia* species: emerging pathogens in pediatric patients that are identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing // Clin Infect Dis. – 2007. – V. 45, № 4. – P. 483–486.
42. Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H., Northcote P.T., Prinsep M.R. Marine natural products // Nat. Prod. Rep. – 2011. – V. 28, № 2. – P. 196–268.
43. Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H., Prinsep M.R. Marine natural products // Nat. Prod. Rep. – 2016. – V. 33, № 3. – P. 382–431.
44. Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! // Clin. Infect. Dis. – 2009. – V. 48, № 1. – P. 1–12.
45. Bulet P., Stöcklin R., Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates // Immunol Rev. – 2004. – V. 198, № 1. – P. 169–184.
46. Bush K., Courvalin P., Dantas G., Davies J., Eisenstein B., Huovinen P., Jacoby G.A., Kishony R., Kreiswirth B.N., Kutter E., Lerner S.A., Levy S., Lewis K., Lomovskaya O., Miller J.H., Mobashery S., Piddock L.J., Projan S., Thomas C.M., Tomasz A., Tulkens P.M., Walsh T.R., Watson J.D., Witkowski J., Witte W., Wright G., Yeh P., Zgurskaya H.I. Tackling antibiotic resistance // Nat. Rev. Microbiol. – 2011. – V. 9, № 12. – P. 894–896.
47. Butler M.S., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011 // J. Antibiot. – 2011. – V. 64, № 6. – P. 413–425.
48. Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013 // J. Antibiot. – 2013. – V. 66, № 10. – P. 571–591.
49. Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015 // J. Antibiot. – 2017. – V. 70, № 1. – P. 3–24.
50. Challinor V.L., Bode H.B. Bioactive natural products from novel microbial sources // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2015. – V. 1354. – P. 82–97.

51. Charousová I., Steinmetz H., Medo J., Javoreková S., Wink J. Soil myxobacteria as a potential source of polyketide-peptide substances // *Folia Microbiol. (Praha)*. – 2017. – V. 62. – P. 305–315.
52. Chatterjee S., Lad S.J., Phansalkar M.S., Rupp R.H., Ganguli B.N., Fehlhaber H.W., Kogler H. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization // *J. Antibiot. (Tokyo)*. – 1992. – V. 45, № 6. – P. 832–838.
53. Chin Y.-W., Balunas M.J., Chai H.B., Kinghorn A.D. Drug discovery from natural sources // *AAPS Journal*. – 2006. – V. 8, №2. – P. 239–253.
54. Coenye T., Vancanneyt M., Falsen E., Swings J., Vandamme P. *Achromobacter insolitus* sp. nov. and *Achromobacter spanius* sp. nov., from human clinical samples // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – V. 53, № 6. – P. 1819–1824.
55. Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. – V. 11, № 2. – P. 95–105.
56. Cragg G.M., Newman D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2013. – V. 1830, № 6. – P. 3670–3695.
57. Crawford J. M., Clardy J. Bacterial symbionts and natural products // *Chem. Commun. (Camb)*. – 2011. – V. 47, № 27. – P. 7559–7566.
58. Cui Y., Zhang C., Wang Y., Shi J., Zhang L., Ding Z., Qu X., Cui H. Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – V. 13, № 12. – P. 16668-16707.
59. Dahm H., Wrótniak W., Strzelczyk E., Li C.Y., Bednarska E. Diversity of culturable bacteria associated with fruiting bodies of ectomycorrhizal fungi // *Phytopathol. Pol.* – 2005. – V. 38. – P. 51–62.
60. Daly K.M., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. Lantibiotic production by pathogenic microorganisms // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2012. – V. 13, № 6. – P. 509–523.
61. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance gene // *Science*. – 1994. – V. 264. – P. 375–382.

62. Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils // FEMS Microbiol. Rev. – 2000. – V. 24, № 4. – P. 403–427.
63. de Carvalho M.P., Türck P., Abraham W.R. Secondary metabolites control the associated bacterial communities of saprophytic basidiomycotina fungi // Microbes Environ. – 2015. – V. 30, № 2. – P. 196–198.
64. D’Costa V. M., King C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W.L., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Debruyne R., Golding G.B., Poinar H.N., Wright G.D. Antibiotic resistance is ancient // Nature. – 2011. – V. 477. – P. 457–461.
65. Domingos D.F., de Faria A.F., de Souza Galaverna R., Eberlin M.N., Greenfield P., Zucchi T.D., Melo I.S., Tran-Dinh N., Midgley D., de Oliveira V.M. Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – V. 99, № 7. – P. 3155–3167.
66. Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Mazza P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M., Puglia A.M. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites // J. Biotechnol. – 2002. – V. 99. – P. 187–198.
67. Donadio S., Maffioli S., Monciardini P., Sosio M., Jabes D. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives // J. Antibiot. (Tokyo). – 2010. – V. 63, №8. – P. 423–430.
68. Drancourt M., Pelletier J., Cherif A.A., Rault D. *Gordonia terrae* central nervous system infection in immunocompetent patient // J. Clin. Microbiol. – 1997. – V. 35. – P. 379-382.
69. Dubos R.J. Studies on a Bactericidal Agent Extracted from a Soil *Bacillus*: I. Preparation of the Agent. Its Activity in Vitro // J. Exp. Med. – 1939. – V. 70, № 1. – P. 1–10.
70. Dusane D.H., Damare S.R., Nancharaiah Y.V., Ramaiah N., Venugopalan V.P., Kumar A.R., Zinjarde S.S. Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *Bacillus licheniformis* // PLoS One. – 2013. – V. 8, № 5. – P. e64501.

71. Duquesne S., Destoumieux-Garzón D., Peduzzi J., Rebuffat S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria // *Nat. Prod. Rep.* – 2007. – V. 24, № 4. – P. 708–734.
72. Egan K., Field D., Rea M.C., Ross R.P., Hill C., Cotter P.D. Bacteriocins: Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems? // *Front. Microbiol.* – 2016. – V. 7. – P. 461.
73. Emmart E.W. A new tuberculostatic antibiotic from a species of *Nocardia* // *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* – 1947. – V. 56, – P. 316–318.
74. Favaro G., Bogialli S., Di Gangi I.M., Nigris S., Baldan E., Squartini A., Pastore P., Baldan B. Characterization of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* using liquid chromatography with accurate tandem mass spectrometry // *Rapid Commun Mass Spectrom.* – 2016. – V. 30, № 20. – P. 2237–2252.
75. Feling R.H., Buchanan G.O., Mincer T.J., Kauffman C.A., Jensen P.R., Fenical W. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2003. – V. 42. – P. 355–357.
76. Fickers P. Antibiotic compounds from *Bacillus*: why are they so amazing? // *Am. J. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – V. 8, № 1. – P. 40–46.
77. Finking R., Marahiel M.A. Biosynthesis of nonribosomal peptides // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2004. – V. 58. – P. 453–488.
78. Fredenhagen A., Angst C., Peter H.H. Digestion of rhizocticins to (Z)-L-2-amino-5-phosphono-3-pentenoic acid: revision of the absolute configuration of plumbemycins A and B // *J. Antibiot.* – 1995. – V. 48, № 9. – P. 1043–1045.
79. Gilbert D.N., Guidos R.J., Boucher H.W., Talbot G.H., Spellberg B., Edwards J.E. Jr, Scheld W.M., Bradley J.S., Bartlett J.G. The 10 x '20 Initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020 // *Clin Infect Dis.* – 2010. – V. 50, № 8. – P. 1081–1083.
80. Gontang E.A., Gaudêncio S.P., Fenical W., Jensen P.R. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine actinobacteria // *App. Env. Microbiol.* – 2010. – V. 76. – P. 2487–2499.

81. Gopal P., Dick T. The new tuberculosis drug Perchlorone® shows cross-resistance with thiacetazone // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2015. – V. 45, № 4. – P. 430–433.
82. Gordon R. E., Barnett D.A., Handerhan J.E., Pang C. H.N. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the Nocardin Strain // *Int. J. of Systematic Bacteriology.* – 1974. – V. 24, № 1. – P. 54–63.
83. Graça A.P., Bondoso J., Gaspar H., Xavier J.R., Monteiro M.C., de la Cruz M., Oves-Costales D., Vicente F., Lage O.M. Antimicrobial activity of heterotrophic bacterial communities from the marine sponge *Erylus discophorus* (Astrophorida, Geodiidae) // *PLoS One.* – 2013. – V. 8, № 11. – P. e78992.
84. Gross M. Antibiotics in crisis // *Current Biology.* – 2013. – V. 23, № 24. – P. R1063-R1065.
85. Gulick A.M. Nonribosomal peptide synthetase biosynthetic clusters of ESKAPE pathogens // *Nat. Prod. Rep.* – 2017. – V. 34, № 8. – P. 981-1009.
86. Gunatilaka A.A. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence // *J. Nat. Prod.* – 2006. – V. 69, № 3. – P. 509–526.
87. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids. Symp. Ser.* – 1999. – V. 41. – P. 95–98.
88. He L., Chen W., Liu Y. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12 // *Microbiol Res.* – 2006. – V. 161, № 4. – P. 321–326.
89. Ikai Y., Oka H., Hayakawa J., Harada K.-I., Suzuki M. Structural characterization of bacitracin components by frit-fast atom bombardment (FAB) liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) // *J. Antibiot.* – 1992. – V. 45, № 8. – P. 1325–1334.
90. Inglis P.W., Burden J.L., Peberdy J.F. Evidence for the association of the enteric bacterium *Ewingella americana* with internal stipe necrosis of *Agaricus bisporus* // *Microbiol.* – 1996. – V. 142. – P. 3255–3260.

91. Itoh J., Omoto S., Shomura T., Nishizawa N., Miyado S., Yuda Y., Shibata U., Inouye S. Amicoumacin-A, a new antibiotic with strong antiinflammatory and antiulcer activity // *J. Antibiot.* – 1981. – V. 34. – P. 611–613.
92. Itoh J., Shōmura T., Omoto S., Miyado S., Yuda Y., Shibata U., Inouye S. Isolation, Physicochemical properties and biological activities of amicoumacins produced by *Bacillus pumilus* // *Agric. Biol. Chem.* – 1982a. – V. 46, – P. 1255–1259.
93. Itoh J., Omoto S., Nishizawa N., Kodama Y., Inouye S. Chemical structures of amicoumacins produced by *Bacillus pumilus* // *Agric. Biol. Chem.* – 1982b. – V. 46. – P. 2659–2665.
94. Jakobi M., Winkelmann G., Kaiser D., Kempler C., Jung G., Berg G., Bahl H. Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089 // *J. Antibiot. (Tokyo)*. – 1996. – V. 49, № 11. – P. 1101–1104.
95. James G.S. Universal bacterial identification by PCR and DNA sequencing of 16S rRNA gene / M. Schuller, T.P. Sloots, C.L. Holliday, G.S. James, I.W.J. Carter. *PCR for Clinical Microbiology*. – New york, NY, USA: Springer; 2010. – P. 209–214.
96. Jasim B., Sreelakshmi S., Mathew J., Radhakrishnan E.K. Identification of endophytic *Bacillus mojavensis* with highly specialized broad spectrum antibacterial activity // *3 Biotech.* – 2016. – V. 6, № 2. – P. 187.
97. Johnson B., Anker H., Meleney F. Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group // *Science.* – 1945. – V. 102. – P. 376–377.
98. Kingston D.G.I. Taxol and its analogs. In: Cragg G.M., Kingston D.G.I., Newman D.J. (eds.). *Anticancer agents from natural products*, 2nd ed. // Taylor and Francis, Boca Raton, Fl, 2012. – P. 123–175.
99. Kobayashi D. Y., Crouch J. A. Bacterial/fungal interactions: from pathogens to mutualistic endosymbionts // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2009. – V. 47. – P. 63–82.
100. Kumari D, Reddy M.S., Upadhyay R.C. Diversity of cultivable bacteria associated with fruiting bodies of wild Himalayan *Cantharellus* spp // *Ann Microbiol.* – 2012. – V. 63. – P. 845–853.

101. Laatsch H. Marine Bacterial Metabolites. In: Proksch P., Muller W.E.G (eds.) *Frontiers in marine biotechnology*. // Horizon Bioscience, England, 2006. – P. 225–288.
102. Lai C.C., Wang C.Y., Liu C.Y., Tan C.K., Lin S.H., Liao C.H., Chou C.H., Huang Y.T., Lin H.I., Hsueh P.R. Infections caused by *Gordonia* species at a medical centre in Taiwan, 1997 to 2008 // *Clin Microbiol Infect.* – 2010. – V. 16, № 9. – P. 1448–1453.
103. Lama A., Pane-Farre J., Chon T., Wiersma A.M., Sit C.S., Vederas J.C., Hecker M., Nakano M.M. Response of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to amicoumacin A // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – P. e34037.
104. Lateef A., Adelere I.A., Gueguim-Kana E.B. The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis* // *Biologia.* – 2015. – V. 70, № 4. – P. 411–419.
105. Law V., Knox C., Djoumbou Y., Jewison T., Guo A.C., Liu Y., Maciejewski A., Arndt D., Wilson M., Neveu V., Tang A., Gabriel G., Ly C., Adamjee S., Dame Z.T., Han B., Zhou Y., Wishart D.S. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42, № 1. – P. D1091–D1097.
106. Leveau, J. H., Preston G. M. Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial-fungal interaction // *New Phytol.* – 2007. – V. 177. – P. 859–876.
107. Lewis K. Persister Cells and the Paradox of Chronic Infections // *Microbe.* – 2010. – V. 5, № 10. – P. 429–437.
108. Li S., Zhao L., Han K., Li P., Li Z., Hu W., Liu H., Wu Z., Li Y. Diversity of epothilone producers among *Sorangium* strains in producer-positive soil habitats // *Microb. Biotechnol.* – 2014. – V. 7, № 2. – P. 130–141.
109. Li Y., Xu Y., Liu L., Han Z., Lai P.Y., Guo X., Zhang X., Lin W., Qian P.Y. Five new amicoumacins isolated from a marine-derived bacterium *Bacillus subtilis* // *Mar. Drugs.* – 2012. – V. 10. – P. 319–328.
110. Loeb L.J., Moyer A., Murray R.J.E. An antibiotic produced by *Micrococcus epidermidis* // *Can. J. Res.* – 1950. – V. 28, № 5. – P. 212-216.

111. Masschelein J., Jenner M., Challis G.L. Antibiotics from Gram-negative bacteria: a comprehensive overview and selected biosynthetic highlights // *Nat. Prod. Rep.* – 2017. – V. 34, № 7. – P. 712–783.
112. Mégraud F. The challenge of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: the comeback of bismuth-based quadruple therapy // *Therap. Adv. Gastroenterol.* – 2012. – V. 5, №2. – P. 103–109.
113. Mikolasch A., Hammer E., Schauer F. Synthesis of imidazol-2-yl amino acids by using cells from alkane-oxidizing bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69. – P. 1670–1679.
114. Mincer T.J., Jensen P.R., Kauffman C.A., Fenical W. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 68. – P. 5005–5011.
115. Mindlin S., Minakhin L., Petrova M., Kholodii G., Minakhina S., Gorlenko Z., Nikiforov V. Present-day mercury resistance transposons are common in bacteria preserved in permafrost grounds since the Upper Pleistocene // *Res. Microbiol.* – 2005. – V. 156, № 10. – P. 994–1004.
116. Mindlin S.Z., Petrova M.A., Bass I.A., Gorlenko Zh.M. Origin, evolution, and migration of drug resistance genes // *Genetika.* – 2006. – V. 42, № 11. – P. 1495–1511.
117. Montalbán-López M., Sánchez-Hidalgo M., Cebrián R., Maqueda M. Discovering the bacterial circular proteins: bacteriocins, cyanobactins, and pilins // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287, № 32. – P. 27007–27013.
118. Morin N., Laneluc I., Connil N., Cottenceau M., Pons A.M., Sablé S. Mechanism of bactericidal activity of microcin L in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – V. 55. – P. 997–1007.
119. Newman D.J., Cragg G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 // *J. Nat. Prod.* – 2016. – V. 79. – P. 629–661.
120. Nilsson S., Persson, O. *Fungi of Northern Europe 1: Larger Fungi (Excluding Gill Fungi).* – Harmondsworth: Penguin Books Ltd., 1978a. – 128 p.

121. Nilsson S., Persson, O. *Fungi of Northern Europe 2: Gill Fungi.* – Harmondsworth: Penguin Books Ltd., 1978b. – 130 p.
122. Nishie M., Nagao J., Sonomoto K. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications // *Biocontrol Sci.*, 2012, 17(1): 1-16.
123. Nordenfjäll E. *Isolation of antibiotic producing microorganisms by screening for antibiotic resistance / Nordenfjäll Emma; Swedish University of Agricultural Sciences.* – Uppsala, 2014. – P. 40.
124. O'Neill J. *The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*, 2016. Available at: http://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf.
125. Oppegård C., Rogne P., Emanuelsen L., Kristiansen P.E., Fimland G., Nissen-Meyer J. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol.* – 2007. – V.13, № 4. – P. 210–219.
126. Partida-Martinez L.P., Hertweck C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production // *Nature.* – 2005. – V. 437, № 6. – P. 884–888.
127. *PCR protocols: a guide to methods and applications / Eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J.* – New York: Academic Press, 1990. – 482 p.
128. Pela'ez F., Genilloud O. Discovering new drugs from microbial natural products. In: Barredo J.L. (ed). *Microorganisms for health care, foods and enzyme production.* // *Research Signpost, Trivendrum*, 2003. – 22 p.
129. Pela'ez F. Biological activities of fungal metabolites. In: An Z. (ed.). *Handbook of industrial mycology. Mycology series.* // *Marcel Dekker Inc., New York*, 2004. – V. 22. – P. 49–92.
130. Perez R.H., Zendo T., Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (lab): Various structures and applications // *Microb. Cell Fact.* – 2014. – V. 13. – P. S3.

131. Petrova M., Gorlenko Z., Mindlin S. Molecular structure and translocation of a multiple antibiotic resistance region of a *Psychrobacter psychrophilus* permafrost strain // FEMS Microbiol. Lett. – 2009. – V. 296. – P. 190–197.

132. Piel J., Hui D., Wen G., Butzke D., Platzer M., Fusetani N., Matsunaga S. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* // Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). – 2004. – V. 101, № 46. – P. 16222–16227.

133. Pinchuk I.V., Bressollier P., Verneuil B., Fenet B., Sorokulova I.B., Mégraud F., Urdaci M.C. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics // Antimicrob Agents Chemother. – 2001. – V. 45, № 11. – P. 3156–3161.

134. Polikanov Y.S., Osterman I.A., Szal T., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Kusochek P., Bulkley D., Malanicheva I.A., Efimenko T.A., Efremenkova O.V., Konevega A.L., Shaw K.J., Bogdanov A.A., Rodnina M.V., Dontsova O.A., Mankin A.S., Steitz T., Sergiev P.V. Amicoumacin A inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome // Mol Cell. – 2014. – V. 56, № 4. – P. 531–540.

135. Raaijmakers J.M., De Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics // FEMS Microbiol Rev. – 2010. – V. 34, № 6. – P. 1037–1062.

136. Rea M. C., Ross R. P., Cotter P. D., Hill C. Classification of bacteriocins from gram-positive bacteria. In: Drider D., Rebuffat S. (eds.). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. // Springer Science+Business Media LLC, New York, 2011. – P. 29–53.

137. Read A.F., Woods R.J. Antibiotic resistance management // Evol. Med. Public Health. – 2014. – V. 1. – P. 147.

138. Reichenbach H. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – V. 27, № 3. – P. 149–156.

139. Reyes J.E., Venturini M.E., Oria R., Blanco D. Prevalence of *Ewingella americana* in retail fresh cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*

and *Pleurotus ostreatus*) in Zaragoza (Spain) // FEMS Microbiol Ecol. – 2004. – V. 47, № 3. – P. 291–296.

140. Rivardo F., Turner R.J., Allegrone G., Ceri H., Martinotti M.G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens // Appl Microbiol Biotechnol. – 2009. – V. 83, № 3. – P. 541–553.

141. Rogers L.A. The Inhibiting Effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus* // J. Bacteriol. – 1928. – V. 16. – P. 321–325.

142. Schmidt E.W., Nelson J.T., Rasko D.A., Sudek S., Eisen J.A., Haygood M.G., Ravel J. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella* // Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). – 2005. – V. 102, № 20. – P. 7315–7320.

143. Schinke C., Martins T., Queiroz S.C.N., Melo I.S., Reyes F.G.R. Antibacterial Compounds from Marine Bacteria, 2010-2015 // J. Nat. Prod. – 2017. – V. 80, № 4. – P. 1215–1228.

144. Schwarzer D., Finking R., Marahiel M. A. Nonribosomal peptides: from genes to products // Nat. Prod. Rep. – 2003. – V. 20, № 3. – P. 275–287.

145. Severinov K., Semenova E., Kazakov T. Class I microcins: Their structures activities, and mechanisms of resistance. In: Drider D., Rebuffat S. (eds.). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. // Springer Science+Business Media LLC, New York, 2011. – P. 289–308.

146. Shi M., Wang H.-N., Xie S.-T., Luo Y., Sun C.-Y., Chen X.-L., Zhang, Y.-Z. Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells // Mol. Cancer. – 2010. – V. 9. – P. 26.

147. Shimojima Y., Hayashi H., Ooka T., Shibukawa M. Studies on AI-77s, microbial products with pharmacological activities. Part I. Production, isolation and pharmacological studies of AI-77s // Agric. Biol. Chem. – 1982. – V. 46. – P. 1823–1829.

148. Singh, R.K., Tiwari S.P., Rai A.K., Mohapatra T.M. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery // *J. Antibiot.* – 2011. – V. 64. – P. 401–412.
149. Singh S.B., Pelaez F. Progress in Drug Research. In: Petersen F. and Amstutz R. (eds.). Biodiversity, chemical diversity and drug discovery. // Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 2008. – V. 65. – P. 141–174.
150. So A.D., Gupta N., Brahmachari S.K., Chopra I., Munos B., Nathan C., Outterson K., Paccaud J.P., Payne D.J., Peeling R.W., Spigelman M., Weigelt J. Towards new business models for R&D for novel antibiotics // *Drug Resist. Updat.* – 2011. – V. 14, № 2. – P. 88–94.
151. Soler-Rivas C., Jolivet S., Arpin N., Olivier J.M., Wichers H.J. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus* // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1999. – V. 23. – P. 591–614.
152. Song L., Jenner M., Masschelein J., Jones C., Bull M.J., Harris S.R., Hartkoorn R.C., Vocat A., Romero-Canelon I., Coupland P., Webster G., Dunn M., Weiser R., Paisey C., Cole S.T., Parkhill J., Mahenthiralingam E., Challis G.L. Discovery and Biosynthesis of Gladiolin: A *Burkholderia gladioli* Antibiotic with Promising Activity against *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Am. Chem. Soc.* – 2017. – V. 139, № 23. – P. 7974–7981.
153. Sowani H., Kulkarni M., Zinjarde S. An insight into the ecology, diversity and adaptations of *Gordonia* species // *Crit Rev Microbiol.* – 2017. – V. 25. – P. 1–21.
154. Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1997. – V. 47. – P. 479–491.
155. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // *Mol. Microbiol.* – 2005. – V. 56, № 4. – P. 845–857.
156. Stonik V.A. Marine natural products: a way to new drugs // *Acta Naturae.* – 2009. – V. 1, № 2. – P. 15–25.
157. Sumi C.D., Yang B.W., Yeo I.C., Hahm Y.T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics // *Can. J. Microbiol.* – 2015. – V. 61, № 2. – P. 93–103.

158. Sun H., He Y., Xiao Q., Ye R. & Tian Y. 2013. Isolation, characterization, and antimicrobial activity of endophytic bacteria from *Polygonum cuspidatum* // Afr. J. Microbiol. Res. – 2013. – V. 7. – P. 1496–1504.
159. Suzuki M., Yamada K., Nagao M., Aoki E., Matsumoto M., Hirayama T., Yamamoto H., Hiramatsu R., Ichiyama S., Inuma Y. Antimicrobial ointments and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 // Emerg. Infect. Dis. – 2011. – V. 17, № 10. – P. 1917–1920.
160. Tamura K., Stecher G., Peterson D., FilipSKI A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. – 2013. – V. 30. – P. 2725–2729.
161. Tyurin A.P., Efimenko T.A., Prokhorenko I.A., Rogozhin E.A., Malanicheva I.A., Zenkova V.A., Efremenkova O.V., Korshun V.A. Amicoumacins and Related Compounds: Chemistry and Biology // SNPC. – 2017. – V. 55. – P. 383–439.
162. Ventola C.L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats // P. T. – 2015. – V. 40, № 4. – P. 277–283.
163. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2007. – V. 71. – P. 495–548.
164. Verma V.C., Kharwar R.N., Strobel G.A. Chemical and Functional Diversity of Natural Products from Plant Associated Endophytic Fungi // Nat. Prod. Commun. – 2009. – V. 4, № 11. – P. 1511–1532.
165. Wang G., Manns D.C., Churey J.J., Worobo, R.W. Development of a homologous expression system for and systematic site-directed mutagenesis analysis of thurincin H, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* SF361 // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – V. 80, № 12. – P. 3576–3584.
166. Wescombe P.A., Heng N.C., Burton J.P., Tagg J.R. Something Old and Something New: An Update on the Amazing Repertoire of Bacteriocins Produced by *Streptococcus salivarius* // Probiotics Antimicrob. Proteins. – 2010. – V. 2, №1. – P. 37–45.

167. Wolf A., Fritze A., Hagemann M., Berg G. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – V. 52, № 6. – P. 1937–1944.
168. Wright G. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification // Adv. Drug Delivery – 2005. – V. 57. – P. 1451–1470.
169. Yakimov M.M., Kröger A., Slepak T.N., Giuliano L., Timmis K.N., Golyshin P.N. A putative lichenysin A synthetase operon in *Bacillus licheniformis*: initial characterization // Biochim. Biophys. Acta – 1998. – V. 1399, № 2-3. – P. 141–153.
170. Yang S.C., Lin C.H., Sung C.T., Fang J.Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals // Front Microbiol. – 2014. – V. 5. – P. 241.
171. Youcef-Ali M., Kacem Chaouche N., Dehimat L., Bataiche I., Kara Ali M., Cawoy H., Thonart P. Antifungal activity and bioactive compounds produced by *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis* // Afr. J. Microbiol. Res. – 2014. – V. 8. – P. 476–484.
172. Zhang J.Y., Liu X.Y., Liu S.J. *Agrococcus terreus* sp. nov. and *Micrococcus terreus* sp. nov., isolated from forest soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2010. – V. 60. – P. 1897–1903.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица 1. Эффективность антибиотиков медицинского назначения в отношении штаммов *S. aureus* INA 00761 (MRSA) и FDA 209P (MSSA), определенная методом дисков.

Антибиотики	Количество на диске	Обозначения на диске	Штаммы	
			FDA 209P	INA 00761
Азитромицин	15 мкг	AZM15	S	R
Амикацин	30 мкг	AN30	S	R
Амоксициллин / Клавулановая кислота	20/10 мкг	AMC30	S	R
Ампициллин	2 мкг	AM2	S	R
Ампициллин	10 мкг	AM10	S	R
Бацитрацин	2 IU/IE/UI	B2	S	S
Ванкомицин	5 мкг	VA5	R	R
Гентамицин	10 мкг	GM10	R	R
Доксициклин	30 мкг	D30	S	R
Канамицин	30 мкг	K30	S	R
Клиндамицин	2 мкг	CC2	S	R
Левофлоксацин	5 мкг	LVX5	S	S
Линкомицин	2 мкг	L2	S	R
Метронидазол	80 мкг	MET80	S	R
Неомицин	5 мкг	N5	R	R
Неомицин	30 мкг	N30	I	R
Новобиоцин	5 мкг	NB5	S	S
Новобиоцин	30 мкг	NB30	S	S
Норфлоксацин	10 мкг	NOR10	R	R
Оксациллин	1 мкг	OX1	S	R
Окситетрациклин	30 мкг	T30	S	R
Офлоксацин	5 мкг	OFX5	S	S
Пенициллин	2 IU/IE/UI	P2	S	R
Пенициллин	10 IU/IE/UI	P10	S	R
Тетрациклин	5 мкг	TE5	S	R
Тетрациклин	30 мкг	TE30	S	R
Тобрамицин	10 мкг	NN10	R	R
Триметоприм	5 мкг	TMP5	S	S
Фосфомицин+ глюкозо-6-фосфат	200 мкг	FOS200	S	S

Продолжение таблицы 1.

Антибиотики	Количество на диске	Обозначения на диске	Штаммы	
			FDA 209P	INA 00761
Фузидиевая кислота	10 мкг	FA10	S	S
Хлорамфеникол	30 мкг	C30	S	S
Цефазолин	30 мкг	CZ30	S	R
Цефалотин	30 мкг	CF30	S	R
Цефотаксим	30 мкг	CTX30	S	R
Цефотаксим / Клавулановая кислота	30/10 мкг	CTX CLA	S	R
Цефтриаксон	30 мкг	CRO30	S	R
Ципрофлоксацин	5 мкг	CIP5	I	I
Эритромицин	2 мкг	E2	S	R
Эритромицин	15 мкг	E15	S	R
Всего:			39	39
R:			5	29
S:			32	9
I:			2	1

Примечание: Интерпретация чувствительности штамма бактерии к антибиотику по диаметрам зон подавления роста (Becton, Dickinson and Company, USA).

Таблица 2. Эффективность антибиотиков медицинского назначения в отношении штамма *L. mesenteroides* VKPM В-4177, определенная методом дисков.

Антибиотики	Количество на диске	Обозначения на диске	VKPM В-4177
Азитромицин	15 мкг	AZM15	S
Амикацин	30 мкг	AN30	S
Амоксициллин/ Клавулановая кислота	20/10 мкг	AMC30	S
Ампициллин	2 мкг	AM2	S
Ампициллин	10 мкг	AM10	S
Бацитрацин	2 IU/IE/UI	B2	S
Бацитрацин	10 IU/IE/UI	B10	S
Ванкомицин	5 мкг	VA5	R
Гентамицин	10 мкг	GM10	S

Продолжение таблицы 2.

Антибиотики	Количество на диске	Обозначения на диске	VKPM В-4177
Доксициклин	30 мкг	D30	S
Канамицин	30 мкг	K30	I
Клиндамицин	2 мкг	CC2	S
Левифлоксацин	5 мкг	LVX5	S
Линкомицин	2 мкг	L2	S
Метронидазол	80 мкг	MET80	R
Неомицин	5 мкг	N5	I
Неомицин	30 мкг	N30	S
Новобиоцин	5 мкг	NB5	S
Новобиоцин	30 мкг	NB30	I
Норфлоксацин	10 мкг	NOR10	R
Оксациллин	1 мкг	OX1	R
Окситетрациклин	30 мкг	T30	S
Офлоксацин	5 мкг	OFX5	S
Пенициллин	2 IU/IE/UI	P2	S
Пенициллин	10 IU/IE/UI	P10	S
Тетрациклин	5 мкг	TE5	S
Тетрациклин	30 мкг	TE30	S
Тобрамицин	10 мкг	NN10	S
Триметоприм	5 мкг	TMP5	R
Фосфомицин+ глюкозо-6-фосфат	200 мкг	FOS200	R
Фузидиевая кислота	10 мкг	FA10	I
Хлорамфеникол	30 мкг	C30	S
Цефазолин	30 мкг	CZ30	I
Цефалотин	30 мкг	CF30	S
Цефотаксим	30 мкг	CTX30	S
Цефотаксим / Клавулановая кислота	30/10 мкг	CTX CLA	S
Цефтриаксон	30 мкг	CRO30	S
Ципрофлоксацин	5 мкг	CIP5	I
Эритромицин	2 мкг	E2	S
Эритромицин	15 мкг	E15	S
Всего:			40
R:			6
S:			28
I:			6

Примечание: Интерпретация чувствительности штамма бактерии к антибиотику по диаметрам зон подавления роста (Becton, Dickinson and Company, USA).

Таблица 3. Эффективность антибиотиков медицинского назначения в отношении штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853, определенная методом дисков.

Антибиотики	Количество на диске	Обозначения на диске	ATCC 27853
Амикацин	30 мкг	AN30	S
Гентамицин	10 мкг	GM10	I
Левифлоксацин	5 мкг	LVX5	R
Метронидазол	80 мкг	MET80	R
Неомицин	30 мкг	N30	R
Норфлоксацин	10 мкг	NOR10	I
Офлоксацин	5 мкг	OFX5	R
Полимиксин В	300 IU/IE/UI	PB300	I
Тобрамицин	10 мкг	NN10	S
Хлорамфеникол	30 мкг	C30	R
Цефотаксим	30 мкг	CTX30	S
Цефотаксим / Клавулановая кислота	30/10 мкг	CTX CLA	S
Цефтриаксон	30 мкг	CRO30	S
Ципрофлоксацин	5 мкг	CIP5	R
Всего:			14
R:			6
S:			5
I:			3

Примечание: Интерпретация чувствительности штамма бактерии к антибиотику по диаметрам зон подавления роста (Becton, Dickinson and Company, USA).

Таблица 4. Эффективность противотуберкулезных препаратов I и II ряда в отношении штаммов *Myc. smegmatis* VKPM Ac 1339 и mc² 155, определенная методом дисков.

Антибиотики	Количество на диске (мкг)	Штаммы	
		VKPM Ac 1339	mc ² 155
Антибиотики I ряда:			
Изониазид	0,25	S	R
Рифампицин	4	R	S
Антибиотики II ряда:			
Амикацин	30	S	S
Канамицин	30	S	S
Офлоксацин	5	S	S
Ципрофлоксацин	5	S	S