

БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АКТИНОБАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БАЙКАЛЬСКИМИ ЭНДЕМИЧНЫМИ АМФИПОДАМИ-ФИТОФАГАМИ, ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОТОПОВ ОЗЕРА

Е.С. Протасов¹, Д.В. Аксенов-Грибанов^{1,2}, М.Е. Краснова¹, И.А. Дмитриев¹,
В.А. Емшанова¹, Е.В. Мадьярова^{1,2}, М.А. Тимофеев¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, protasov.evgenii@gmail.com

²Автономная некоммерческая организация «Байкальский исследовательский центр», Иркутск, Россия

Аннотация. В ходе проведения работы исследован биосинтетический потенциал актинобактерий, выделенных из двух групп эндемичных ракообразных озера Байкал – литоральных и глубоководных амфипод. Показано преобладание представителей рода *Streptomyces* для обеих групп амфипод. Тестирование биосинтетической активности с помощью диск-диффузионного метода проводили против ряда модельных микроорганизмов – *E. coli*, *P. putida*, *B. subtilis*, *S. carnosus*, *S. cerevisiae*. Проведенное исследование выявило наличие штаммов как с направленной активностью против отдельных групп микроорганизмов (грамотрицательных, грамположительных, грибов), так и широкого спектра активности.

Ключевые слова: актинобактерии, амфиподы, эндемики, озеро Байкал

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1344-1347

В настоящее время наблюдается рост случаев заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными штаммами, что представляет серьезную проблему для современной медицины. Особую значимость это приобретает в свете медленного развития новых антибиотиков [Redgrave et al., 2014]. Природные соединения, выделенные из различных организмов – растений, животных и микроорганизмов, по-прежнему остаются основным источником для создания новых лекарств не только в борьбе с инфекционными заболеваниями, но и при борьбе с раком, заболеваниями иммунной системы, при трансплантации органов и др. [Wright, 2017]. Одной из наиболее продуктивных групп микроорганизмов, ответственных за синтез примерно 60% всех биологически активных метаболитов, открытых в период с 1940-х по 2010, являются актинобактерии. При этом, представители этой группы синтезируют такие важные классы соединений, как полиеновые макролиды, макролиды типа олигомицина, антрациклины, большинство аминогликозидов и актиномицинов [Bérduy, 2012]. Как и в других группах продуцентов биологически активных веществ, среди актинобактерий наблюдается снижение числа открытий новых веществ и высокий процент повторного выделения уже известных соединений. Для решения этой проблемы исследователи сместили свое внимание на малоисследованные объекты, такие как морские осадки и беспозвоночные [Beemelmans et al., 2016; Dhakal et al., 2017]. Вместе с тем, перспективными для исследования являются экосистемы с длительной эволюцией и специфическими абиотическими условиями. Одной из таких экосистем является озеро Байкал.

В данном исследовании мы изучили две группы байкальских эндемичных амфипод-фитофагов (*Amphipoda*, *Crustacea*) на предмет наличия ассоциированных с ними актинобактерий и их биосинтетического потенциала. В первой группе (литоральных амфипод) нами было выделено 8 штаммов актинобактерий из четырех видов амфипод: *Eulimnogammarus cruentus*, *E. viridis*, *Brandtia latissima lata*, *E. cyaneus*. По результатам филогенетического анализа гена 16S рРНК 5 штаммов было отнесено к роду *Streptomyces*, а 3 других к роду *Micromonospora*. Амфиподы были собраны с

глубин от 0,5 до 20 м в районе Южного Байкала. Также были выделены и штаммы из глубоководных амфипод видов *Pallasea brandtii flavices*, *Crypturopus tuberculatus*, *Acanthogammarus godleuskii* (Dyb., 1874), *E. ussolzewii* (Dyb.), *E. aheneus*, *Ommatogammarus carneolus melanophthalmus*, выловленных с глубин от 126 до 300 м. Как и в литоральной группе, подавляющее число штаммов (11) было отнесено к роду *Streptomyces*. Однако также было показано наличие представителей других родов – *Pseudonocardia* (2), *Amycolatopsis* (1), а также одного штамма из рода *Micromonospora* (табл. 1).

Таблица 1.

Список штаммов актинобактерий, выделенных из байкальских эндемичных амфипод

Штамм	Вид амфипод	Глубина пробоотборам
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P97-2	<i>Eulimnogammarus cyaneus</i>	0,5
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P97-4	<i>Eulimnogammarus cyaneus</i>	0,5
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P32-2	<i>Brandtia (Brandtia) latissima lata</i>	4
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P36-1	<i>Brandtia (Brandtia) latissima lata</i>	4
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P38-4	<i>Brandtia (Brandtia) latissima lata</i>	4
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P39-1	<i>Brandtia (Brandtia) latissima lata</i>	4
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P22-1	<i>Eulimnogammarus cruentus</i>	20
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P28-2	<i>Eulimnogammarus (Philolimnogammarus) viridis viridis</i>	20
<i>Pseudonocardia</i> sp. IB2015P10-1	<i>Pallasea brandtii flavices</i>	126
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P11-2	<i>Crypturopus tuberculatus</i>	126
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P11-3	<i>Crypturopus tuberculatus</i>	126
<i>Pseudonocardia</i> sp. IB2015P11-4	<i>Crypturopus tuberculatus</i>	126
<i>Amycolatopsis</i> sp. IB2015P14-2	<i>Acanthogammarus godleuskii</i>	126
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P138-1	<i>Eulimnogammarus ussolzewii</i>	150
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P138-2	<i>Eulimnogammarus ussolzewii</i>	150
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P139-1	<i>Eulimnogammarus aheneus</i>	150
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P139-2	<i>Eulimnogammarus aheneus</i>	150
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P140-1	<i>Odontogammarus calearatus pulcherrimus</i>	150
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P141-1	<i>Ommatogammarus carneolus melanophthalmus</i>	200
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P142-1	<i>Eulimnogammarus ussolzewii</i>	300
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P143-1	<i>Ommatogammarus carneolus melanophthalmus</i>	300
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P143-2	<i>Ommatogammarus carneolus melanophthalmus</i>	300
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P143-3	<i>Ommatogammarus carneolus melanophthalmus</i>	300

Для изучения биосинтетического потенциала актинобактерий чистые культуры были выращены в жидкой среде NL-19 (маннитол – 20 г/л, соевая мука – 20 г/л, вода водопроводная – 1 л) в течение 5-10 дней. Для получения экстрактов полученный после центрифугирования супернатант смешивали с равным объемом этилацетата и интенсивно встряхивали в течение часа на шейкере. Далее этилацетатную вытяжку испаряли в вакуумном испарителе, а получившийся сухой экстракт ресуспендировали в 500 мкл метанола. Для проведения антибиотических тестов предварительно подсушенные бумажные диски (с нанесенными 40 мкл экстракта) укладывали на

поверхность свежепосеянных и подсохших тест-культур *E. coli*, *P. putida*, *B. subtilis*, *S. carnosus*, *S. cerevisiae*. Чашки с тест-культурами культивировали в течение 24 часов в термостате при оптимальных для роста тест-культур температурах, после чего были оценены зоны ингибирования.

Таблица 2.

Антибиотическая активность выделенных штаммов актинобактерий против тест-микроорганизмов

Штамм	<i>B. subtilis</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>P. putida</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P97-2	+	+	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P97-4	+	-	+	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P32-2	-	-	+	+	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P36-1	+	-	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P38-4	+	+	-	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P39-1	-	+	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P22-1	+	+	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P28-2	+	+	+	+	-
<i>Pseudonocardia</i> sp. IB2015P10-1	+	+	+	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. IB2015P11-2	+	+	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P11-3	-	-	-	-	-
<i>Pseudonocardia</i> sp. IB2015P11-4	-	-	-	-	-
<i>Amycolatopsis</i> sp. IB2015P14-2	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P138-1	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P138-2	+	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P139-1	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P139-2	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P140-1	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P141-1	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P142-1	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P143-1	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P143-2	-	+	+	+	-
<i>Streptomyces</i> sp. IB2015P143-3	-	+	+	+	-

По результатам исследования антибиотической активности было показано наличие штаммов как со специфичной активностью против грамположительных *Micromonospora* sp. IB201511-2, *Streptomyces* sp. IB2015P22-1, *Streptomyces* sp. IB2015P97-2), так и против широкого круга тест-культур (*Pseudonocardia* sp. IB201510-1, *Streptomyces* sp. IB2015143-2, *Streptomyces* sp. IB2015P36-1). Вместе с тем, среди выделенных штаммов, лишь один – *Micromonospora* sp. IB2015P32-2 проявил специфическую активность против грамотрицательных культур *E. coli* и *P. putida* (табл. 2). Как видно из табл. 2, как в группе актинобактерий, выделенных из литоральных амфипод, так и в группе бактерий, выделенных из глубоководных амфипод, присутствуют штаммы, характеризующиеся как узко направленной активностью против одного типа микроорганизмов, так и с широкой активностью против различных тест-объектов.

Таким образом, озеро Байкал и его обитатели, особенно эндемики-фитофаги, обитающие длительное время в условиях постоянных и низких температур и повышенного содержания кислорода, могут обладать специфическими связями с симбионтной микрофлорой. Микроорганизмы, ассоциированные с амфиподами из различных экотопов озера, по-видимому, обладают специализированными метаболическими путями, позволяющими им синтезировать новые соединения для защиты своих хозяев. Предварительные исследования биосинтетического потенциала

актинобактерий, ассоциированных с эндемичными амфиподами озера Байкал, показывают их перспективность как источника новых штаммов и природных соединений.

Данное исследование было выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-14-01063, РФФИ (16-34-60060, 18-34-00294), Госзадания 6.9654.2017/8.9, совместной программы Михаил Ломоносов германской службы академических обменов DAAD и Министерства образования и науки РФ (6.12737.2018/12.2, 6.12738.2018/12.2) и гранта фонда Байкал.

Литература

Beemelmanns C. et al. Natural products from microbes associated with insects // Beilstein J. Org. Chem. – 2016. – V. 12. – P. 314–327.

Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading // J. Antibiot. (Tokyo). – 2012. – V. 65, No. 8. – P. 385–395.

Dhakal D. et al. Marine rare actinobacteria: Isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – No. JUN.

Redgrave L.S. et al. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success // Trends Microbiol. – 2014. – V. 22, No. 8. – P. 438–445.

Wright G.D. Opportunities for natural products in 21 st century antibiotic discovery // Nat. Prod. Rep. – 2017. – V. 34, No. 7. – P. 694–701.

BIOSYNTHETIC POTENTIAL OF ACTINOBACTERIA ASSOCIATED WITH LAKE BAIKAL ENDEMIC AMPHIPOD-PHYTOPHAGES FROM DIFFERENT LAKE'S ECOTOPES

E.S. Protasov¹, D.V. Axenov-Gribanov^{1, 2}, M.E. Krasnova¹, I.A. Dmitriev¹, V.A. Emshanova¹, E.V. Madyarova^{1, 2}, M.A. Timofeyev¹

¹Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, *protasov.evgenii@gmail.com*

¹Baikal Research Center, Irkutsk, Russia

Abstract. The biosynthetic potential of actinobacteria isolated from two groups of endemic crustaceans of Lake Baikal, littoral and deep-water, were studied. It was shown the predominance of the specimens from the genus *Streptomyces* for both groups of amphipods. The test of biosynthetic activity was conducted by means of disk-diffusion method against a number of model microorganisms, *E. coli*, *P. putida*, *B. subtilis*, *S. carnosus*, *S. cerevisiae*. The conducted study revealed the strains with both targeted activity against specific type of microorganisms (Gram negative, Gram positive, or fungi) and a wide range of activity.

Keywords: *actinobacteria, amphipods, endemics, Baikal*