

На правах рукописи

Куликова Нина Георгиевна

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

Специальность 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2017

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

Научный руководитель:

Терехова Лариса Петровна,
доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ
«НИИНА», заведующая Отделом микробиологии

Официальные оппоненты:

Стоянова Лидия Григорьевна,
доктор биологических наук, ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова», доцент кафедры
микробиологии

Бибикова Маргарита Васильевна,
доктор биологических наук, генеральный
директор научно-технологической организации
ООО «ВИОРИН»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Научно-исследовательский институт
детских инфекций федерального медико-
биологического агентства»

Защита состоится «30» марта 2017 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 001.005.01 при ФГБНУ «НИИНА» по адресу: 119021, Москва, Б. Пироговская ул., д. 11, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИНА» и на сайте <http://www.gause-inst.ru>

Автореферат разослан « » 20 г.

Приглашаем Вас принять участие в обсуждении диссертации на заседании Диссертационного совета. Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 119021, Москва, Б. Пироговская ул., д. 11, корп. 1. Ученый совет.

Учёный секретарь
диссертационного совета, к.фарм.н.

В. И. Пономаренко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

Одним из важных этапов поиска и разработки новых антибиотиков является выделение актинобактерий-продуцентов из природных мест обитания. Основным источником выделения актинобактерий является почва. Вместе с тем они распространены и в других, менее традиционных для выделения, экологических системах – пресной и морской воде, горячих источниках, ледниковых отложениях, а также в различных частях растений – корнях, листьях, стеблях и плодах [Macagnan et al., 2006; Khanna et al., 2011; Adegboye et al., 2012]. Для выделения актинобактерий из природных источников применяются различные методы, как традиционные, так и селективные, которые основаны на изменении состава селективной среды или предварительной обработке образцов химическими, физическими и биологическими агентами. Приемы, применяющиеся в селективных методах изоляции микроорганизмов, позволяют увеличить таксономическое разнообразие культур прокариот, которые выделяются из исследуемого образца. Несмотря на обилие применяемых методов выделения, современные молекулярно-биологические подходы, которые основаны на метагеномном секвенировании природных образцов, показали, что в чистую культуру выделено менее 1% всего существующего микробного многообразия, в то время как оставшиеся некультивируемые формы могут быть потенциальными продуцентами антибиотиков с новыми механизмами биологического действия и химическими структурами [Bérdu, 2005; Davis et al., 2005; Baltz, 2008; Babalola et al., 2009; Alam et al., 2010; Kumar et al., 2010].

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

Цель и задачи исследования. Цель исследования состояла в разработке новых селективных методов выделения актинобактерий из различных экосистем – почвы и листьев лекарственных растений, и поиска продуцентов антибиотических веществ среди выделенных культур.

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

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

Научная новизна. Разработан новый метод селективного выделения актинобактерий из почвы с добавлением в питательные среды биологически активных соединений – адреналина и гетероауксина. Показано, что добавление биомедиаторов в состав агаризованных питательных сред приводит к увеличению количества выделенных колоний актинобактерий по сравнению с контролем. Разработанный метод способствовал селективному выделению культур актинобактерий, которые условно принято называть редкими, – *Micromonospora* spp., *Actinoplanes* spp., *Nonomuraea* spp. и *Catellatospora* spp. Добавление адреналина (1 мкг/мл) и гетероауксина (20 мкг/мл) в состав селективных сред способствовало выделению большего, по сравнению с контролем, количества штаммов

актинобактерий, активных в отношении грамположительных, в том числе метициллинорезистентного стафилококка (MRSA), и грамотрицательных тест-бактерий, а также дрожжеподобных грибов.

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

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

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

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

Применение разработанных селективных методов позволяет увеличить долю антибиотически активных штаммов актинобактерий, выделяемых из природных источников. Среди антибиотически активных культур актинобактерий, выделенных разработанными в данной работе методами, были выявлены штаммы, активные в отношении метициллинорезистентного стафилококка (MRSA), которые представляют

наибольший интерес для дальнейших исследований в связи с возрастающей устойчивостью патогенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам, применяемым в клинике.

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

Основные положения, выносимые на защиту

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

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

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность проведенных исследований подтверждается результатами статистической обработки результатов всех экспериментальных данных, публикацией результатов в научных изданиях из списка ВАК, а также апробацией работы на международных и всероссийских конференциях.

Основные положения работы были представлены на конференции студентов и молодых ученых МГУИЭ (Москва, 2010), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов. Прошлое, настоящее, будущее» (Москва, 2011), Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012), VII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013) (была награждена дипломом и медалью за лучшую научно-исследовательскую работу), международной конференции «Актуальные проблемы современной науки» (Варшава, 2013), XIII Съезде Общества микробиологов Украины им. С. В. Виноградского (Ялта, 2013) (была награждена дипломом за лучший устный доклад), XXII Международной

конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2015), V Юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2015), IV Международной конференции «Микробное разнообразие: ресурсный потенциал. ICOMID – 2016» (Москва, 2016) (была награждена дипломом победителя за лучший стендовый доклад).

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

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

Объем и структура работы. Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 4-х глав результатов исследования, обсуждения полученных результатов, выводов, списка использованной литературы и приложения. Материалы диссертации изложены на 145 страницах, содержат 15 таблиц и 17 рисунков. Список литературы включает 215 источников, в том числе 175 на иностранном языке.

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

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

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

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении дано обоснование актуальности диссертационной работы, сформулированы цель и задачи исследований, научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Охарактеризованы основные положения, выносимые на защиту, личный вклад автора, апробация и публикации представленной работы. Описана структура и объем диссертации.

Глава 1. Обзор литературы

Обзор литературы представленной работы посвящен эндофитным микроорганизмам – особенностям их распространения и свойствам, которыми они обладают. В обзоре описаны полученные из эндофитных актинобактерий антибиотики и другие биологически активные вещества, также рассмотрены существующие методы селективной изоляции и таксономическое разнообразие актинобактерий-эндофитов, выделенных из растений.

Глава 2. Объекты и методы исследования.

Объектами исследования служили 10 образцов почв и листья 20-ти лекарственных растений, собранных в Москве и Московской области. Образцы почв были отобраны в Раменском и Озерском районах Московской области в летне-осенний период из верхних горизонтов почв (горизонты А, А₁), под разнообразной растительностью; сбор образцов листьев производился в весенне-летний период, выделение актинобактерий из листьев растений проводили непосредственно в день сбора или в течение ближайших 2 – 3 дней. В работе исследовали листья следующих растений: *Achillea millefolium* L. (тысячелистник обыкновенный), *Aloe arborescens* L. (алоэ древовидное), *Anthoxanthum odoratum* L. (душистый колосок обыкновенный), *Arctium lappa* L. (лопух большой), *Convallaria majalis* L. (ландыш майский), *Fragaria vesca* L. (земляника лесная), *Geranium pratense* L. (герань луговая), *Hippophae rhamnoides* L. (облепиха), *Lysimachia nummularia* L. (вербейник монетчатый), *Matricaria matricarioides* (ромашка душистая, безъязычковая), *Melilotus officinalis* L. (донник лекарственный), *Mentha arvensis* L. (мята полевая), *Plantago major* L. (подорожник большой), *Rosa cinnamomea* (шиповник коричный), *Rubus idaeus* L. (малина обыкновенная), *Tanacetum vulgare* L. (пижма обыкновенная), *Taraxacum officinale* L. (одуванчик лекарственный), *Trifolium pratense* L. (клевер луговой), *Urtica dioica* L. (крапива двудомная) *Viola odorata* L. (фиалка душистая).

В качестве *селективных агентов* были использованы растворы биологически активных соединений: адреналина, индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и циркона. Адреналин и ИУК представляют собой соединения биогенных аминов (биомедиаторов), которые являются всеобщими агентами раздражимости присущими любой живой клетке. Посредством биогенных аминов регулируются метаболические и энергетические процессы в растительных и животных клетках, а также у микроорганизмов [Рощина, 2010]. В работе использовали синтетический адреналин,

лекарственное средство под торговым названием «Адреналин (эпинефрин)» (Московский эндокринный завод, Россия). Ввиду того, что ИУК плохо растворима в воде, была использована водорастворимая калиевая соль ИУК, которая является действующим веществом препарата «Гетероауксин» (ООО Ортон, Россия). Препарат циркон является биологически активным соединением, которое активизирует ростовые процессы у растений, обладает сильным фунгицидным и антистрессовым действием. В работе использовали препарат под торговым названием «Циркон» (ННПП «НЭСТ М», Россия).

Для выделения актинобактерий из почвенных образцов был разработан новый метод изоляции актинобактерий, в котором растворы биологически активных соединений – адреналина и гетероауксина были добавлены в селективные среды.

Для приготовления почвенных суспензий 100 мг почвы помещали в 10 мл стерильной воды, встряхивали в течение 10 минут, затем суспензию разводили в отношении 1:1000 и 1:10000 и высевали на чашки Петри с селективной средой. В среду, на которую производился посев почвенных суспензий, добавляли адреналин в концентрации 1 мкг/мл и/или гетероауксин в концентрации 20 мкг/мл. Помимо растворов-стимуляторов в питательные среды добавляли антибиотики налидиксовую кислоту (30 мкг/мл) и амфотерицин В (50 мкг/мл) для подавления роста стелющихся бактерий и грибов [Терехова и др., 1990]. Посев почвенных суспензий проводили традиционным методом поверхностного посева на органическую среду 2 Гаузе и овсяный агар [Гаузе и др., 1983] в семикратной повторности. Засеянные чашки инкубировали в течение 14 суток при 28°C.

Для выделения актинобактерий-эндофитов из листьев лекарственных растений был разработан новый метод изоляции эндофитных актинобактерий из растений средней полосы России.

Для приготовления опытных образцов 1 г растительной ткани очищали от земли и тщательно промывали под проточной водой. Поверхностную стерилизацию листьев проводили в этиловом спирте (75%) в течение 5 минут, затем в 1% растворе гипохлорита натрия (NaOCl) в течение 20 минут. Далее образцы промывали 3 раза стерильной дистиллированной водой и выдерживали в 10% растворе гидрокарбоната натрия (NaHCO₃) в течение 5–10 минут [Bacon, 1988; Araújo et al., 2000; Otoguro et al., 2001; Cao et al., 2004; Omarjee et al., 2004; Qin et al., 2009]. Затем растительные ткани выдерживали в растворах гетероауксина (20 мкг/мл) и/или циркона (1 мкг/мл) в течение 20 минут. Предварительно растворы гетероауксина и циркона пропускали через мембранный фильтр диаметром пор 0,22 мкм с целью стерилизации растворов. После предобработки селективными агентами образцы листьев нарезали маленькими кусочками, помещали в пробирки со стерильной дистиллированной водой (10 мл) и выдерживали в термостате в течение 1 часа при температуре 28°C, периодически перемешивая. Полученные суспензии высевали традиционным методом поверхностного посева на органическую среду 2 Гаузе и овсяной агар [Гаузе и др., 1983], затем инкубировали при температуре 28°C в течение 3-х недель.

Все эксперименты по выделению эндофитных актинобактерий были проверены на *эффективность поверхностной стерилизации* тканей растений: последние порции дистиллированной воды, которой промывали исследуемые образцы высевали на чашки Петри с органическим агаром 2 Гаузе и инкубировали в течение 3-х недель при температуре 28°C; стерилизованные поверхностные ткани листьев отпечатывали на органическом агаре 2 Гаузе, после чего чашки помещали в термостат и инкубировали в течение 3-х недель при 28°C [Qin et al., 2009]. Отсутствие роста колоний на чашках говорил об эффективности поверхностной стерилизации растительных тканей.

Количественный учет актинобактерий, выделенных из почвы и листьев растений, производили общими и специфическими методами математической статистики [Платонов, 2010; Gorban et al., 2010].

Определение таксономического положения выделенных актинобактерий проводилась на основе определения фенотипических, хематоксономических и геносистематических признаков, используя определитель актинобактерий [Гаузе и др., 1983], определитель Берджи [Определитель бактерий Берджи, 1997; Yamaguchi, 1965] и базы данных GenBank NCBI¹ и Ribosomal Database Project² (RDP).

Фенотипические признаки (морфологические и культуральные) изучали у культур, выращенных на минеральном агаре 1 Гаузе, овсяном агаре и органическом агаре 2 Гаузе [Гаузе и др., 1983]. Морфологические признаки изучали, просматривая культуры в световом микроскопе OLYMPUS BX-41 при увеличении $\times 200$, $\times 400$ и $\times 1000$ мкм.

Изомеры диаминопимелиновой кислоты (ДАПК) и анализ дифференцирующих сахаров в гидролизатах целых клеток определяли с помощью методов восходящей тонкослойной хроматографии в целлюлозном слое [Lechevalier, 1971].

Для выделения ДНК из исследуемых образцов, выращенных на жидкой органической среде 2 Гаузе, применяли набор для выделения Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, США) согласно методике Манучаровой [Манучарова, 2010].

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, была использована универсальная праймерная система: 27f, 341f-gcd, 785f, 907r, 1100r, 1492r (СИНТОЛ, Россия). Для проведения ПЦР амплификации использовали набор реагентов GenPak qPCR Core (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Амплификацию проводили в автоматическом амплификаторе 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США).

Определение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили с использованием универсальной системы прямых и обратных праймеров 27f – 1492r на автоматическом капиллярном секвенаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями изготовителя.

¹ URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

² URL: <http://rdp.cme.msu.edu>

Редактирование последовательностей осуществляли с помощью редактора BioEdit, а их множественное выравнивание с использованием программы CLUSTAL OMEGA 1.1.1. Идентификацию актинобактерий проводили при помощи сравнения нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагментов генов 16S рРНК с последовательностями, представленными в базе данных GenBank NCBI по протоколу nBLAST и Ribosomal Database Project (RDP). Построение филогенетических деревьев исследуемых штаммов актинобактерий производили с использованием алгоритма «ближайшего соседа» («neighbor-joining») методами, реализованными в пакете программы MEGA 6. Статистическую достоверность порядка ветвления определяли с помощью «bootstrap»-анализа 1000 альтернативных деревьев.

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

Биосинтез антибиотиков при глубинном культивировании редких культур актинобактерий проводился на следующих жидких питательных средах: органическая среда 2 Гаузе с мелом, среда А₄, среда 330, среда 6613, среда 2663, среда 5339, среда 11654, среда «сах», среда «тобрекс». Антибиотическую активность культур проверяли по отношению ко всем вышеперечисленным тест-бактериям. Для индукции образования антибиотиков были использованы растворы биологически активных соединений – адреналина (1 мкг/мл) и гетероауксина (20 мкг/мл), которые были добавлены в жидкие питательные среды с первого дня культивирования актинобактерий.

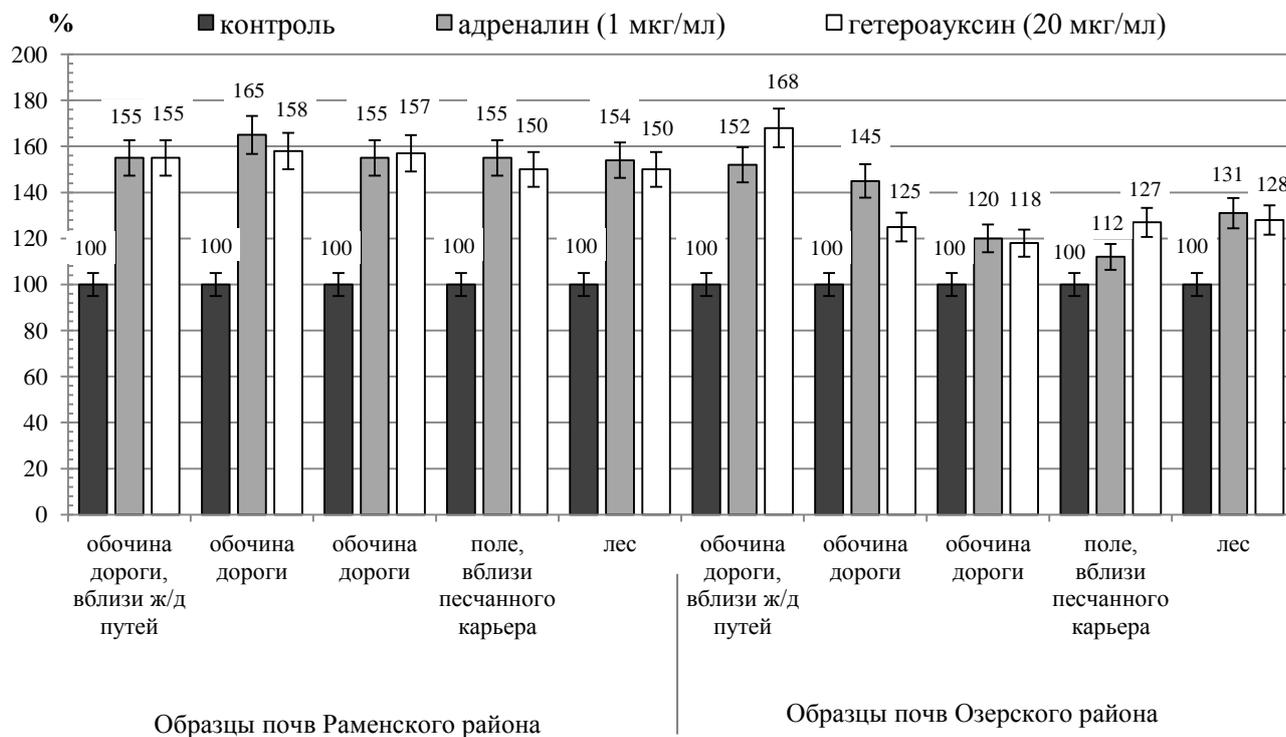
Статистическую обработку результатов всех исследований проводили с использованием программы Excel 2010 (Microsoft Inc., 2011), рассчитывая среднее количество колоний актинобактерий на чашках Петри, ошибки средних, доверительные интервалы, стандартное отклонение и ряд других параметров. Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента, достоверность различий соответствовала $p \leq 0,05$.

Глава 3. Разработка нового метода выделения актинобактерий из почвы с добавлением биогенных аминов

Предпосылкой к разработке метода выделения актинобактерий из почвы с применением гормональных соединений послужили литературные сведения об индукции роста и стабилизации популяционного состава культур немикелиальных бактерий и актинобактерий биогенными аминами (биомедиаторами) – серотонином, норадrenalином, адреналином и дофамином [Кагарлицкий и др., 2003; Филиппова и др., 2010]. Представленные исследования дали основания полагать, что биомедиаторы

будут способствовать эффективному выделению культур актинобактерий из почвы за счет стимуляции прорастания большего количества спор, находящихся в почве.

Первоначально были проведены исследования по изучению влияния адреналина и гетероауксина на прорастание спор почвенных актинобактерий и подбору концентраций данных растворов, которые позволили бы добиться прорастания большего количества спор почвенных актинобактерий на чашках Петри. В результате серии экспериментов по добавлению селективных агентов в почвенные суспензии и питательные среды в различных концентрациях, было обнаружено, что стимулирующее действие на прорастание спор актинобактерий происходило при добавлении биомедиаторов в питательные среды (рисунок 1). Добавление селективных агентов проводили в концентрациях: адреналина - 0,1, 0,5, 1, 1,5 и 2 мкг/мл, гетероауксина – 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мкг/мл. Оптимальными концентрациями действия были: адреналина – 1 мкг/мл, гетероауксина – 20 мкг/мл. В связи с этим дальнейшие исследования проводили с применением адреналина и гетероауксина в качестве компонентов питательной среды в данных концентрациях.



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

Рисунок 1. Процентное соотношение колоний почвенных актинобактерий, выделенных на чашки Петри с применением адреналина и гетероауксина в качестве селективных агентов.

В результате выделения актинобактерий из 10-ти образцов почв Московской области выявлено, что с добавлением адреналина численность выросших колоний актинобактерий в зависимости от образца почвы возрастает на 12-65%, а с добавлением гетероауксина – на 18-58% по сравнению с контролем (рисунок 1). Общее количество выросших колоний актинобактерий на средах с селективными

агентами увеличивалось в 1,6 раз с добавлением адреналина, в 1,5 раза – гетероауксина. По нашему мнению, увеличение количества выросших колоний на средах с добавлением селективных агентов обусловлено сигнальным воздействием биогенных аминов на рецепторы клетки, регулирующие активность ферментов, за счет чего происходит инициация прорастания большего количества спор [Рощина, 2010; Филиппова и др., 2010].

Результаты изучения фенотипических и геносистематических признаков 1500 штаммов (100%) почвенных актинобактерий, выделенных в чистую культуру, показали, что 960 штаммов (64%) принадлежат *Streptomyces* spp., что согласуется с многочисленными литературными данными о том, что актинобактерии рода *Streptomyces* являются наиболее распространенным родом в экосистеме [Гаузе, 1963; Bérdy, 2005; Baltz, 2007; Alam et al., 2010]. В настоящее время внимание исследователей, работающих в области поиска продуцентов антибиотиков, продуцируемых актинобактериями, привлекают культуры, не принадлежащие к роду *Streptomyces*, которые принято условно считать культурами редких родов. В наших исследованиях всего было выделено 507 штаммов редких родов актинобактерий: 453 культуры (30,2%) принадлежали *Micromonospora* spp., 20 штаммов (1,3%) – *Catellatospora* spp., 17 культур (1,13%) – *Actinoplanes* spp. и 17 штаммов (1,13%) – *Nonomuraea* spp.

Применение биогенных аминов в качестве компонентов селективной среды позволило увеличить количество культур *Micromonospora* spp., выделяемых в чистую культуру: адреналина (1 мкг/мл) – в 3,8 раза, гетероауксина (20 мкг/мл) – в 2,75 раз по сравнению с контролем. Стоит отметить, что культуры редких родов *Actinoplanes*, *Nonomuraea* и *Catellatospora* были выделены только на селективных средах с добавлением биомедиаторов, в контроле их не было выделено.

У некоторых штаммов редких родов *Actinoplanes*, *Nonomuraea* и *Catellatospora*, которые представляли интерес с таксономической точки зрения, были изучены нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК. Результаты изучения филогенетических признаков культур редких родов показали, что штаммы принадлежат видам *Actinoplanes auranticolor*, *Nonomuraea jabiensis* и *Catellatospora methionotrophica* (рисунок 2). Штаммы были внесены в коллекцию культур ИНА, с присвоением индивидуальных номеров: INA 01094, INA 01095 и INA 01096 соответственно. Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК культур депонированы в GenBank NCBI с присвоением индивидуальных номеров доступа KJ425225, KJ425224 и KJ425226 соответственно.

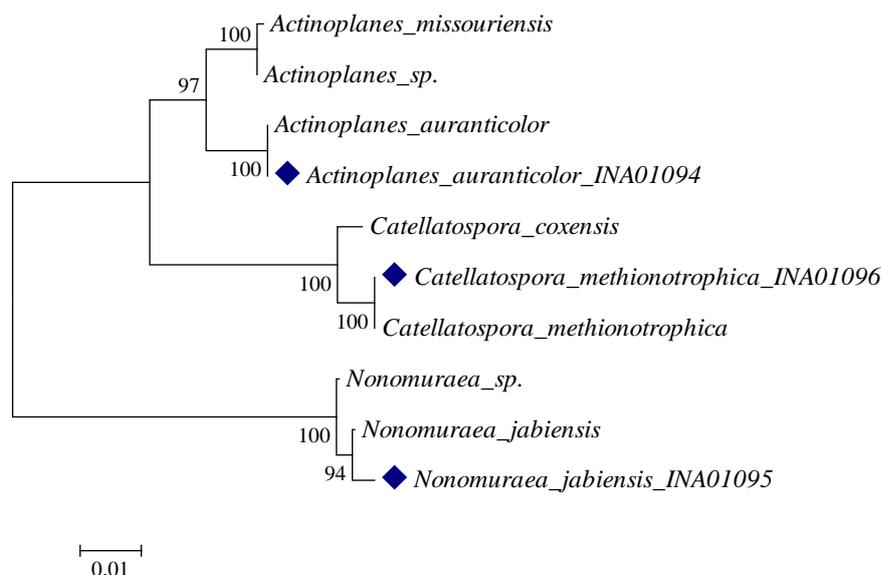


Рисунок 2. Филогенетическое дерево редких родов актинобактерий, выделенных из почв. Штаммы, выделенные в представленной работе, обозначены ромбами. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «ближайшего соседа» (neighbor-joining), масштаб соответствует эволюционным расстояниям, цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью "bootstrap"-анализа 1000 альтернативных деревьев

Таким образом, был разработан новый метод выделения актинобактерий из почвы, в котором впервые применялись растворы биомедиаторов – адреналина (1 мкг/мл) и гетероауксина (20 мкг/мл). Разработанный метод позволил не только увеличить общее количество выделенных культур порядка Actinomycetales, но и способствовал выделению культур редких таксонов (не относящихся к роду *Streptomyces*) – *Micromonospora* spp., *Actinoplanes* spp., *Nonomuraea* spp. и *Catellatospora* spp., которые в настоящее время считаются перспективными продуцентами еще неизученных антибиотиков.

Глава 4. Разработка нового метода выделения эндофитных актинобактерий из листьев лекарственных растений

В последние годы большое внимание уделяется изучению эндофитных актинобактерий, привлекающих внимание в качестве потенциальных продуцентов новых биологически активных веществ [Strobel et al., 2006; Qin et al., 2011; Ambrose et al., 2013; Abdalla et al., 2014; Akshatha et al., 2014; Gangwar et al., 2014; Golinska et al., 2015]. Для выделения эндофитных микроорганизмов из различных тканей растений существует множество методов изоляции [Bacon, 1988; Araujo et al., 2000; Otaguro et al., 2001; Cao et al., 2004; Omarjee et al., 2004; Qin et al., 2009]. Однако, применяя их, выделить эндофитные актинобактерии из листьев лекарственных растений средней полосы России не удалось.

В связи с этим нами был разработан новый метод выделения эндофитных актинобактерий, позволяющий выделять актинобактерии-эндофиты из растений средней полосы России. Согласно данным источников литературы, процедура

поверхностной стерилизации (состав стерилизующего агента, его концентрация и время обработки) должна быть оптимизирована для каждой растительной культуры [Strobel et al., 2003; Qin et al., 2011]. Ввиду этого были поставлены серии экспериментов, в результате которых были подобраны: состав стерилизующих агентов, их оптимальные концентрации и время действия на растительные ткани. Для того чтобы растительные ткани не высыхали в процессе выделения эндофитных актинобактерий, нами впервые были приготовлены водные суспензии из листьев растений, которые высевались на чашки Петри.

С целью стимуляции прорастания большего количества спор эндофитных актинобактерий в дальнейшем применяли растворы биомедиаторов. В качестве стимулирующих агентов были взяты растворы адреналина и гетероауксина, так как они стимулировали прорастание большего количества спор актинобактерий, изолированных из почвы. Была проведена серия опытов по подбору концентраций и времени обработки данными агентами. В результате проведенных опытов было показано, что предобработка листьев адреналином в диапазоне концентраций 0,1-2 мкг/мл не оказывает стимулирующего действия на эндофитные актинобактерии, а предобработка гетероауксином в концентрации 20 мкг/мл приводит к увеличению количества выросших колоний в 3,1 раз по сравнению с контролем. В связи с тем, что гетероауксин оказался эффективным для выделения большего количества колоний актинобактерий-эндофитов, было использовано другое биологически активное соединение растительного происхождения – циркон, который влияет на активизацию биохимических процессов в клетках. Подбор концентрации и времени обработки растительных тканей цирконом также устанавливался опытным путем. Оптимальная концентрация действия циркона составила 1 мкг/мл, время обработки – 20 минут. При обработке листьев данным соединением количество выделяемых колоний увеличивалось в 2,5 раза по сравнению с контролем (таблица 1).

Таблица 1. Результаты применения гетероауксина и циркона для выделения актиномицетов-эндофитов из листьев лекарственных растений.

	Контроль	Циркон	Гетероауксин	всего
$\frac{\text{КОЕ эндофитных актинобактерий}}{\text{г растительной ткани}} \times 10^3$	27±0,2	68±0,51	84±0,63	179±1,34
Доля колоний, %	15	38	47	100

Следует отметить, что из всех 20-ти исследованных образцов растений эндофитные актинобактерии были выделены благодаря предобработке растений селективными агентами, в то время как в контроле актинобактерии-эндофиты были выделены только из 14 растений (рисунок 3). По всей видимости, являясь стимуляторами деления клеток в растениях, гетероауксин и циркон способны связываться со специфическими мембранными рецепторами и оказывать индуцирующее воздействие на клеточный метаболизм эндофитных микроорганизмов, за счет чего происходит прорастание большего количества спор микроорганизмов-эндофитов [Кагарлицкий и др., 2003].



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

Рисунок 3. Количество колоний эндофитных актинобактерий, выросших на чашках Петри.

Всего в чистую культуру было выделено 120 штаммов эндофитных актинобактерий. На основе изучения фенотипических и геносистематических признаков была проведена таксономическая идентификация выделенных актинобактерий-эндофитов, результаты которой представлены в таблице 2.

Таблица 2. Таксономическое положение штаммов эндофитных актинобактерий, выделенных из листьев лекарственных растений.

Селективный агент	Количество штаммов				
	<i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Nocardia</i>	Неидентиф. роды	Всего штаммов
Контроль	9	4	2	1	16
Циркон	22	9	1	3	37
Гетероауксин	43	20	5	1	67
Всего штаммов	74	33	8	5	120

Примечание: В процессе работы некоторые штаммы теряли свою жизнеспособность после нескольких пересевов, вследствие чего их таксономическое положение не было определено, их отнесли к группе «неидентифицированные роды» (неидентиф. роды).

Исходя из данных таблицы 2, среди выделенных штаммов преобладающими были культуры *Streptomyces* spp., что согласуется с литературными данными [Bérdu, 2005; Qin et al., 2009; Qin et al., 2011; Ambrose et al., 2011; Huang et al., 2012; Gangwar et al., 2014; Golinska et al., 2015]. Как видно из представленной таблицы, предобработка растительных тканей гетероауксином и цирконом способствует увеличению

количества выделяемых культур *Streptomyces* spp. в 4,8 раза, а предобработка цирконом – в 2,4 раза по сравнению с контролем.

Предобработка листьев селективными агентами стимулировала выделение культур, так называемых редких родов актинобактерий, которые не принадлежат роду *Streptomyces*. Обработка гетероауксином увеличивала количество культур *Micromonospora* spp. в 5 раз по сравнению с контролем и способствовала выделению культур *Nocardiopsis* spp. Обработка цирконом увеличивала количество культур *Micromonospora* spp. в 2,3 раза по сравнению с контролем.

В результате изучения фенотипических и хемотаксономических признаков выделенных культур эндофитных актинобактерий были отобраны 8 штаммов, не относящихся к *Streptomyces* spp. и *Micromonospora* spp. У данных культур были изучены геносистематические признаки посредством изучения нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, которые показали, что отобранные 8 штаммов принадлежат разным видам рода *Nocardiopsis*: *N. sp.*, *N. umidischolae*, *N. viridoflava*, *N. tropica*, *N. exhalans*, *N. dassonvillei* и *N. quinghaiensis* (2 штамма) (рисунок 4). Штаммы были внесены в коллекцию культур ИНА и депонированы в базу данных GenBank NCBI с присвоением индивидуальных номеров доступа: ИНА 01099 – KJ425228, ИНА 01100 – KJ425229, ИНА 01101 – KJ425230, ИНА 01102 – KJ425231, ИНА 01103 – KJ425232, ИНА 01104 – KJ425233, ИНА 01097 – KJ425227, ИНА 01105 – KJ425234 соответственно.

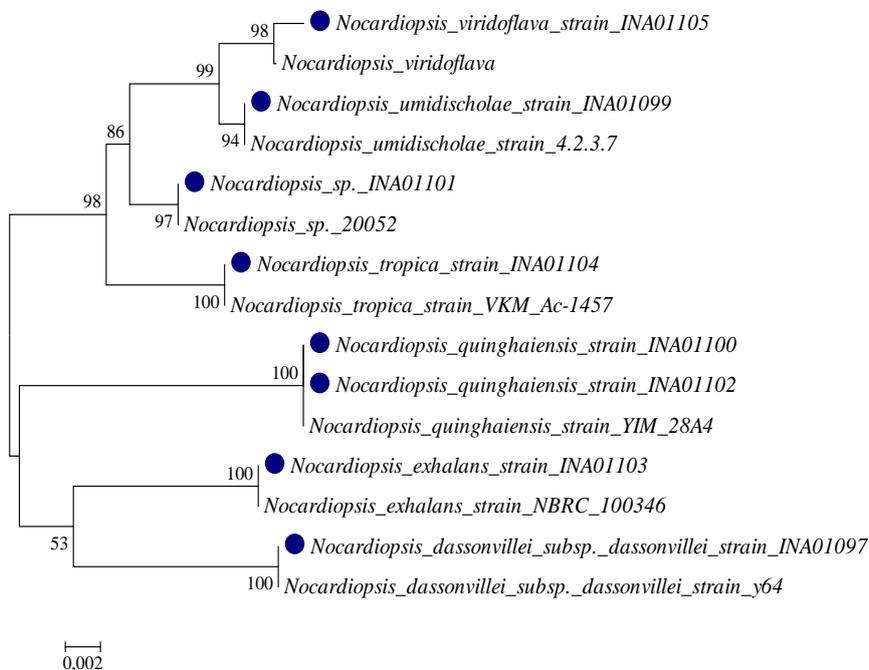


Рисунок 4. Филогенетическое дерево актинобактерий-эндофитов, выделенных из листьев лекарственных растений. Депонированные штаммы обозначены кружками. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «ближайшего соседа» (neighbor-joining), масштаб соответствует эволюционным расстояниям, цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью "bootstrap"-анализа 1000 альтернативных деревьев.

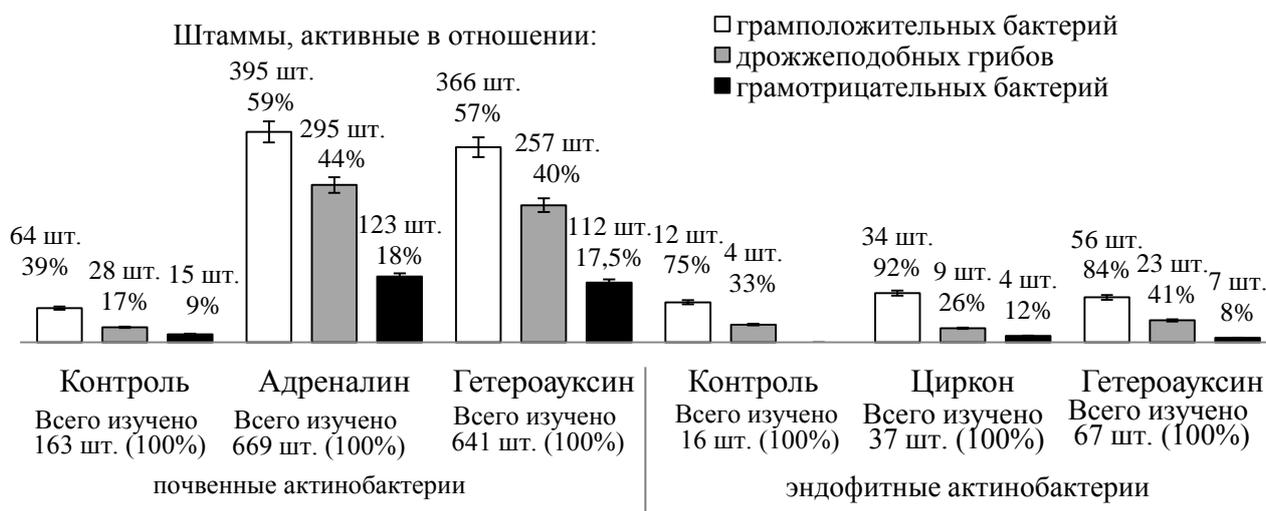
Разработанным в представленной работе методом из листьев лекарственных растений средней полосы России были выделены эндофитные актинобактерии *Streptomyces* spp., *Micromonospora* spp. и *Nocardiosis* spp. Похожие результаты по количеству выделенных родов эндофитных актинобактерий описаны в нескольких зарубежных работах, где выделение проводили из корней и листьев растений тропических лесов. Несмотря на то, что растения тропических лесов отличаются большим биоразнообразием по сравнению с растениями средней полосы России, выделенные в работах зарубежных авторов культуры актинобактерий-эндофитов принадлежали небольшому таксономическому разнообразию родов: у Coombs и Franco (2003) выделенные культуры принадлежали родам *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora* и *Nocardioidea*, у Cao и соавторов (2004) – *Streptomyces*, *Streptoverticillium* и *Nocardia*.

Таким образом, был разработан новый селективный метод выделения эндофитных актинобактерий из тканей растений, позволяющий выделять эндофитные актинобактерии из поверхностно-стерилизованных тканей растений умеренно-континентального климата Российской Федерации. Новизна метода состоит в том, что впервые растительные ткани обрабатывались растворами иммуномодулятора циркона и биомедиатора гетероауксина; впервые была приготовлена суспензия из растительных тканей, тогда как в известных методах растительные ткани нарезаются на маленькие кусочки и помещаются на поверхность агаровых сред. Разработанные приемы предобработки растительных образцов позволяют выделять большее количество штаммов актинобактерий из растений, а также способствуют выделению культур редких и малоизученных родов эндофитных актинобактерий – потенциальных продуцентов новых антибиотиков.

Изучение антагонистических свойств актинобактерий, выделенных из почвы и листьев лекарственных растений

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

В процессе изучения антибиотических свойств выделенных культур было отмечено, что применение селективных агентов – адреналина (1 мкг/мл), гетероауксина (20 мкг/мл) и циркона (1 мкг/мл), способствует выделению большего количества актинобактерий, обладающих антибиотической активностью в отношении всех изученных тест-бактерий (рисунок 5). Применение гетероауксина и циркона для предобработки листьев способствовало выделению антибиотически активных культур в отношении грамотрицательных бактерий (рисунок 5).



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

Рисунок 5. Влияние селективных агентов – гетероауксина, адреналина и циркона на выделение из почв и листьев лекарственных растений антибиотически активных штаммов актинобактерий.

По результатам определения таксономического положения и изучения антибиотического спектра действия у 1593 культур актинобактерий – 1473 штаммов почвенных и 120 штаммов эндофитных актинобактерий, было отобрано 36 культур, перспективных для дальнейшего изыскания продуцентов антибиотиков. Данные культуры принадлежали *Streptomyces* spp., *Nonomuraea* spp., *Actinoplanes* spp. и *Nocardiosis* spp. Культуры были переданы для дальнейшей работы в другие подразделения института.

Глава 5. Индукция образования антибиотиков при глубинном культивировании штаммов редких родов актинобактерий

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

Из источников литературы известно, что биосинтез антибиотиков инициируется посредством ауторегуляторов или мутагенеза [Малкина, 1998; Черногор, Винников, 2004]. Также известно, что биомедиаторы влияют на биохимические и метаболические процессы в клетках [Рощина, 2010]. Предположив, что растворы биогенных аминов могут оказать инициирующее действие на биосинтез антибиотиков, посредством влияния на экспрессию и генов и метаболические пути антибиотикообразования у актинобактерий, мы провели серию экспериментов по

подбору их действующих концентраций. В результате проведенных экспериментов были установлены оптимальные концентрации действия адреналина – 1 мкг/мл и гетероауксина – 20 мкг/мл. Проверка чувствительности тест-бактерий к адреналину и гетероауксину показала, что к установленным концентрациям биогенных аминов тест-бактерии не чувствительны.

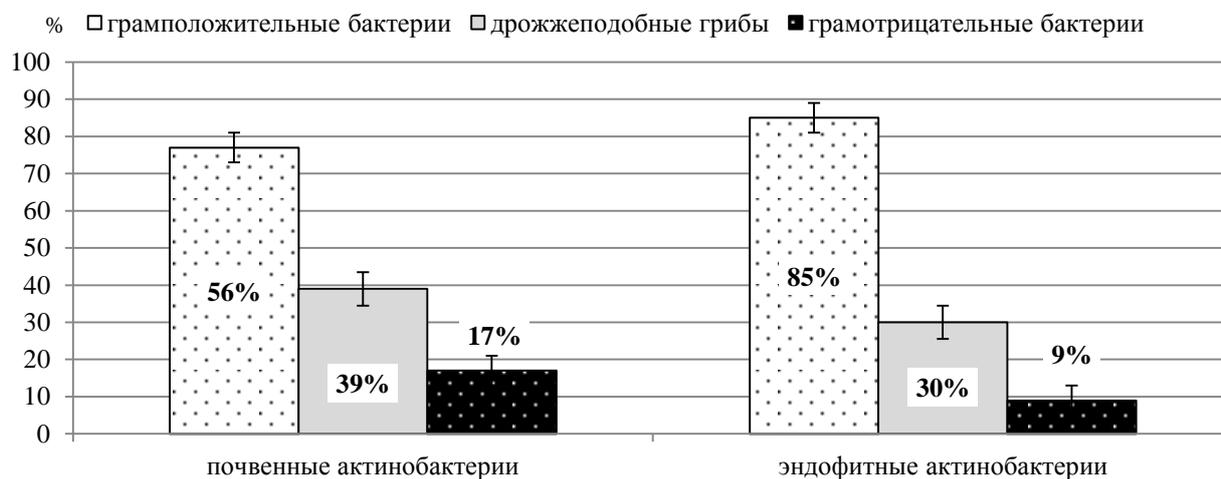
В результате проведенных экспериментов по индукции биосинтеза антибиотиков путем добавления в жидкие питательные среды биологически активных соединений выявлено, что при ферментации культур на жидких питательных средах – среде 2663, органической среде 2 Гаузе с мелом и среде 11654 с адреналином (1 мкг/мл) и/или гетероауксином (20 мкг/мл) выявлено, что 8 штаммов из 15-ти обладают антибиотической активностью в отношении грамположительных тест-бактерий *Staphylococcus aureus* ИНА 00762 и *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Вероятнее всего, адреналин и гетероауксин, являясь биогенными аминами, могут стимулировать активацию ферментов синтеза вторичных метаболитов посредством активизации биохимических и метаболических процессов в клетках [Рощина, 2010; Herbert et al., 1964].

Итак, путем добавления биогенных аминов в состав жидких питательных сред было индуцировано антибиотикообразование у большинства изученных культур, что имеет очень важное практическое значение, так как многие культуры, выделенные из экосистем, не проявляют антибиотической активности на стандартных жидких питательных средах *in vitro*, следовательно, образующиеся ими антибиотические вещества не изучаются, что, в свою очередь, может привести к потере потенциальных продуцентов антибиотиков с новыми ценными свойствами.

Глава 6. Сравнительное исследование таксономического разнообразия и антибиотической активности актинобактерий почвы и растений

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

Сопоставление антагонистических свойств актинобактерий почв и растений показало, что по сравнению с эндофитными актинобактериями среди почвенных актинобактерий больше культур обладает активностью в отношении дрожжеподобных грибов (на 9%) и грамотрицательных тест-бактерий (на 8%). Среди эндофитных актинобактерий, по сравнению с почвенными, на 29% больше культур, проявляющих антибиотическую активность в отношении грамположительных тест-бактерий (рисунок 6).



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

Рисунок 6. Процентное соотношение антибиотически активных актинобактерий, выделенных из почвы и растений.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

разработанные методы выделения актинобактерий, способствовали выделению антибиотически активных культур в отношении грамположительных тест-бактерий, в том числе метициллинорезистентного стафилококка (MRSA), грамотрицательных тест-бактерий и дрожжеподобных грибов.

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

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

ВЫВОДЫ

1. Разработан новый метод изоляции актинобактерий из почвы с применением биогенных аминов – адреналина и/или гетероауксина, способствующий селективному выделению культур *Micromonospora* spp., *Actinoplanes* spp. и *Nonomuraea* spp., а также редко выделяющихся культур *Catellatospora* spp.
2. Разработан новый метод селективного выделения эндофитных актинобактерий с применением гетероауксина и циркона, способствующий выделению большего количества культур актинобактерий-эндофитов, в том числе штаммов *Micromonospora* spp. и редко изолируемых культур эндофитов *Nocardiosis* spp. Направленное изучение эндофитных актинобактерий, населяющих внутренние ткани растений средней полосы России, было проведено впервые.
3. Установлено, что адреналин, гетероауксин и циркон являются стимуляторами прорастания спор актинобактерий: применение данных соединений приводит к увеличению количества выделяемых культур актинобактерий.
4. Создана коллекция почвенных и эндофитных актинобактерий, включающая редко выделяющиеся штаммы *Catellatospora* spp. и *Nocardiosis* spp., которая может служить ресурсным потенциалом микроорганизмов, как для научных исследований, так и для изыскания продуцентов антибиотиков для медицинского и биотехнологического применения. Таксономическое положение выделенных культур актинобактерий было установлено традиционными и молекулярно-генетическими методами.
5. Показано, что выделение актинобактерий из почвы на селективные среды с добавлением адреналина и гетероауксина увеличивало количество выделяемых актинобактерий, активных в отношении грамположительных тест-бактерий, включая метициллинорезистентного стафилококка (MRSA), на 29% и 26% соответственно. Показано, что предобработка растительных тканей гетероауксином и цирконом увеличивает количество выделяемых антибиотически активных штаммов эндофитных актинобактерий на 19% и 17% соответственно, а

также способствует выделению актинобактерий, активных в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*.

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

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Куликова Н.Г.**, Терехова Л.П. Разработка метода для выделения актиномицетов–эндофитов, продуцентов биологически активных веществ для медицинского применения // Сборник материалов V Юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – СПб.: Изд-во СПХФА. – 2015. – С. 178-181. *
2. **Machavariani N. G. (Kulikova N.G.)**, Ivankova T. D., Sineva O. N., Terekhova L.P. Isolation of Endophytic Actinomycetes from Medicinal Plants of the Moscow Region, Russia // World Applied Sciences Journal. – 2014. – V. 30 (11). – P. 1599-1604.
3. **Мачавариани Н.Г. (Куликова Н.Г.)**, Терехова Л.П. Биологически активные соединения, образуемые микроорганизмам-эндофитами // Антибиотики и химиотерапия. – 2014. – Т. 59. – № 5-6. – С. 26-33. *
4. **Мачавариани Н.Г. (Куликова Н.Г.)**, Терехова Л.П. Новый метод выделения актиномицетов из почвы // Материалы международной конференции. «Актуальные проблемы современной науки». – 2013. – Т.1. – С. 9-12. **
5. **Мачавариани Н.Г. (Куликова Н.Г.)**, Кустова Н.А., Галатенко О.А. Выделение актиномицетов – продуцентов антибиотиков из почвы селективными методами, основанными на активации прорастания спор // «Химическое и нефтегазовое машиностроение». – 2010. – С. 21. *

Тезисы докладов и сообщений:

6. **Куликова Н. Г.**, Терехова Л.П. Разработка нового метода выделения эндофитных актинобактерий из растений средней полосы России и изучение биоразнообразия выделенных культур // Микробное разнообразие: ресурсный потенциал: тез. докл. IV Междунар. конф. / Ин-т экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; Перм. гос. нац. исслед. ун-т. – М.; Пермь, 2016. – С.46-48.
7. **Куликова Н.Г.** Разработка нового метода выделения эндофитных актинобактерий из лекарственных растений // Материалы XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2015». Секция «Биология». Сборник тезисов докладов. – 2015. – С. 222-223.

* статья, опубликованная в рецензируемом журнале, который рекомендован ВАК Минобрнауки РФ для публикации результатов диссертационных работ

** Сборнику присвоен идентификационный код ISBN: 978-83-6320-04-2 (t-1), включённый в РИНЦ. Публикации в сборнике имеют статус статей

8. **Мачавариани Н.Г. (Куликова Н.Г.),** Галатенко О.А., Терехова Л.П. Разработка нового метода выделения актиномицетов-эндофитов и выявление культур, потенциальных для биотехнологического использования // Материалы VII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2013. – С.202-203.
9. **Мачавариани Н.Г. (Куликова Н.Г.),** Терехова Л.П. Выделение актиномицетов-эндофитов из листьев лекарственных растений Москвы и Московской области // XIII Съезд Общества микробиологов Украины им. С.М. Виноградского. Сборник Тезисов докладов. – 2013. – С. 181.
10. **Мачавариани Н.Г. (Куликова Н.Г.),** Галатенко О.А., Терехова Л.П. Выделение актиномицетов-эндофитов, образующих антибиотики, из листьев лекарственных растений // Материалы Международной конференции «Биология – наука XXI века». – 2012. – С. 567-568.
11. **Мачавариани Н.Г. (Куликова Н.Г.),** Галатенко О.А., Терехова Л.П. Выделение актиномицетов – потенциальных продуцентов антибиотиков из почвы селективными методами с использованием соединений, стимулирующих прорастание спор // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием "Биологически активные вещества микроорганизмов. Прошлое, настоящее, будущее». – 2011. – С. 79.
12. **Мачавариани Н.Г. (Куликова Н.Г.).** Выделение актиномицетов – продуцентов антибиотиков из почвы селективными методами, основанными на активации прорастания спор // Материалы научной конференции студентов и молодых ученых МГУИЭ. – 2010. – С. 13-14.