



НОВЫЕ ШТАММЫ *STREPTOMYCES* ИЗ ПОЧВ ИССЫК-КУЛЬСКОЙ КОТЛОВИНЫ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИИ

New isolates of *Streptomyces* from Issyk-Kul region soils for biopharmacology

T.D Doolotkeldieva

C. T. Bobusheva

M. W. Konurbaeva

Kyrgyz-Turkish Manas University, Bishkek, Kyrgyzstan

tdoolotkeldieva@gmail.com

АННОТАЦИЯ

3889 колония образующие единицы актиномицетов прошли скрининг через *E.coli* культуры содержащие резистентные к известным применяемым в лечебной практике антибиотикам плазмиды, в результате было получено 54 изолятов *Streptomyces* продуцирующих потенциально новые антибиотики. В результате молекулярного скрининга с помощью полукетид синтетаза праймеров были обнаружены новые PKS гены в почвах Иссук-Кульской области. Были созданы космид библиотеки PKS генов, полученных из почв Иссук-Кульской области.

Ключевые слова : почва, штаммы *Streptomyces*, скрининг штаммов, антибиотические вещества, ПЦР анализ, PKS генов.

Abstract

3889 colony forming units of actynomyces have been screened through *E.coli* cultures containing the resistant to known antibiotics plasmids used in medical practice. 54 isolates of *Streptomyces* producing potentially new antibiotic compounds have been screened. New PKS genes in soils of Issuk-Kul region have been found as a result of molecular screening by polyketide synthetase primers. The cosmid libraries of PKS genes have been created from soils sampled from Issuk-Kul region.

Key words: soil, *Streptomyces* isolates, screening for antibiotic substances, PCR analysis, PKS genes.

Введение

Микробы хорошо известные и давние источники антибиотиков. Первый истинный антибиотик был открыт Флемингом случайно в 1928 году. Это был пенициллин, произведенный грибом *Penicillium notatum*. Первый бактериальный антибиотик – стрептомицин, продуцированный *Streptomyces griseus* был обнаружен Ваксманом в 1944 [6]. Прокариотические микроорганизмы являются потенциальными источниками ценных биоактивных соединений - антиинфекционных агентов (антибиотиков), ферментов и витаминов. Выше 17.000 видов антибиотических веществ и других биоактивных микробных метаболитов существуют в текущей базе данных [5].

Большинство видов антибиотиков продуцируемые микроорганизмами получены от актиномицетов. В особенности, род *Streptomyces* является в этом аспекте самым значимым, представляя около 80 % актиномицетных антибиотиков [8]. Исследования показали, что многие виды *Streptomyces* выделенные из

почв Кыргызстана были продуцентами биологически активных соединений имеющих применение в растениеводстве и лесоводстве как биостимуляторы роста всходов, саженцев и как биофунгициды для защиты растений от грибных болезней [3,9].

Способность актиномицетов продуцировать вторичные метаболиты с различными полезными свойствами (как антибактериальные, антитуморные агенты, иммуносупрессанты, против опухолевые) широко используется в фармакологической промышленности [1, 10].

Основным местообитанием актиномицетов является почва. Известно, что типичный почвенный образец содержит свыше 10,000 различных бактериальных видов. Из них 99 % не подлежат культивированию обычным традиционным способом. Если только 1,0 % культивируемых бактерий дают 17,000 активных молекул, то еще ожидается в науке открытие огромного количества вторичных метаболитов, в том числе антибиотиков. Возникает проблема иметь доступа до химического разнообразия не культивируемых микробов, если мы не сможем их культивировать.

Изученность почвенных прокариотов в Кыргызстане составляет всего 0,005 % от мирового количества известных видов. Имеющие в стране уникальные экосистемы служат средой обитания и адаптации для огромного разнообразия микроорганизмов – эндемиков, имеющих неизвестных генов с полезными продуктами [4].

Целью настоящей работы явился поиск и скрининг штаммов актиномицетов, способных продуцировать новые антибиотические вещества в целях применения их в фармацевтической промышленности для получения эффективных лекарственных препаратов.

Методы и объекты исследований

Отбор почвенных образцов проводили из различных экосистем Иссык-Кульской котловины, на глубине 10 см от поверхности покрова, в пяти индивидуальных точках по трансекту. Для того чтобы иметь более полный доступ к химическому разнообразию почвенных прокариотов нами были использованы несколько подходов их выявления. Один из них - традиционный метод культивирования и скрининга колониеобразующих единиц актиномицетов, другой молекулярный метод.

Почвенные типы представляли : лесные черноземновидные, луговые альпийские почвы, темные лесные почвы, светло-каштановые почвы под сельскохозяйственными растениями и луговые темные солено-щелочные болотные почвы. В ущелье Ак-Суу, на высотах от 2020 до 2145 м образцы были взяты в еловых лесных экосистемах, лесных черноземновидных, луговых альпийских почвах, в ущелье Жети-Огуз в еловых лесных экосистемах, а также в арчевых лесах, луговых альпийских почвах и темных лесных почвах. Светло-каштановые почвы были отобраны в агроландшафтах под сельскохозяйственными культурами (картофель, гречка, пшеница и вика). Кроме того для исследования были подвергнуты почвы южного побережья озера Иссык-Куль - луговые темные солено-щелочные болотные почвы. Эти почвы имеют различные значения рН и отличаются по происхождению, по структуре по содержанию гумуса, по агрохимическому составу.

Молекулярный метод исследования

Экстракцию общей ДНК проводили непосредственно из почвенной вытяжки в обогащенной среде используя Ultra Clean™ Soil DNA Isolation Kit и альтернативный протокол MO BIO Company.

Экстракция ДНК из чистых культур. Чистые культуры были культивированы на МПА за 48 часов при тем. 25⁰С. Клетки бактерий собирали на ранней стадии экспоненциальной фазы роста и потом их ДНК была выделена по протоколу MO BIO Company.

ПЦР анализ и амплификация генов. Амплификацию проводили на приборе Multigene Thermal Cycler (TC9600-G/TC, Labnet International) используя 15 µl PCR Master Mix (Taq DNA polymerase, MgCl₂, deoxyribonucleotide triphosphate and буфер), 2µl каждого праймеры, 1µl ДНК образца и 1 µl воды. Программа амплификации была: 94°C for 5 мин, 35циклов - 94°C за 30 сек, 55°C за 30сек, 72°C за 60 сек и 72°C за 7 мин. ПЦР продукты были разделены в 1,0 % агарозном электрофорезном геле. Визуализацию геля проводили с помощью BioDoc -ItTM системы (ItTM Imaging Systems (Ultra-Violet Products Ltd) после окрашивания бромидом этидия. Для контроля возможной контаминации был использован негативный контроль, в котором вместе образца была добавлена стерильная вода.

Праймеры. Почти полной длины фрагментов гена 16S rRNA были амплифицированы используя следующие праймеры : 16S-27F и 16S-907R.

Секвен анализ был проведен в Macrogen Company (10F World Meridian Center , # 60-24 Gasandong, Geumchun-gu Seoul, Korea, 153-023) и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью Applied Biosystems 3730XL. Поиск нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank осуществлялся с помощью программы BLAST n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) [12].

Традиционный метод культивирования и скрининга колониеобразующих единиц. Для выделения и поддержания культур актиномицетов были использованы YEPG Medium, ISP 4 Medium, крахмально-аммиачный агар (КАА), овсяной агар. Идентификацию выделенных штаммов до рода и видов проводили по известным методам [2,7], на основании микроморфологических и хемо таксономических (биохимических) признаков. Для отбора продуцентов – стрептомицетов новых антибиотических соединений проводили скрининг полученных колоний через *E.coli* культуры содержащих резистентные к известным применяемым в лечебной практике антибиотикам плазмиды: *E. Coli* EPI100-TiR (lamda-phage resistant), *E. Coli* J53-pCFF34 (Ak Km Nm Su Tc Tm Bla) , (J. Clin Microbiol 34:908-911, 1996), *E. Coli* J53-pMG223 (Ak Cm Gm Km Nm Sm Sp Su Tc Tm Tr Bla) (Antimicrob Agents Chemother 35:164-169, 1991).

Статистические анализы бактериального биоразнообразия и 16S rRNA генов

Биоразнообразие стрептомицетов в различных типах почв Иссык-Кульской области было оценено использованием индекса Шеннона ($H' = -\sum p_i \ln p_i$) [13].

Степень богатства видов было оценена с использованием метода разрежения. Измерение доминирующих видов оценивали индексом Симпсона, модифицированным Хилл [13] : $S^*_1 = S_{obs} + (a^2/2b)$

Sobs - количество обнаруженных видов

a - количество один раз обнаруженных видов

b - количество дважды обнаруженных видов

Каждый результат показан как среднее значение не менее чем из трех независимых экспериментов ± стандартная ошибка среднего. Для анализа использовался критерий Стьюдента . Значение $P < 0,05$ использовалось как минимум для определения статистической значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Природные экосистемы Иссык-Кульской котловины впервые были вовлечены в исследования с точки зрения выявления микробиологического разнообразия почв для биотехнологических целей.

Особенность таких экосистем привлекающих внимание ученых – это зональность по вертикальным поясам, различные уникальные типы почв, отличающиеся по генезису и механическому и биологическому составам и по растительности, по умеренному климату, а также зачастую не подвергавшиеся к сильному антропогенному воздействию. Результаты скрининга для выявления антибиотических соединений отражены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты скрининга через *E.coli* культуры содержащие резистентные к известным антибиотикам плазмиды.

(n = 3889, x = 17, H' = 6, 72, S*₁ = 2,13, P = 0.005)

Номер образцов	Место отбора почвенных образцов	Кол-во выросших колоний, из разведений 10 ⁻³ /г почвы	Кол-во штаммов после 1-скрининга	Кол-во штаммов после 3-скрининга
KMI_00036	Ущелье Ак-суу, еловые леса, луговые альпийские почвы, 2202 м.н.у.м.	291	8	6
KMI_00037	Ущелье Ак-суу, еловые леса, луговые альпийские почвы, 2206 м.н.у.м.	233	8	7
KMI_00038	Ущелье Ак-суу, лесные черноземновидные , 2145 м.н.у.м.	778	7	4
KMI_00039	Ущелье Ак-суу, лесные черноземновидные , 2092 м.н.у.м.	345	7	5
KMI_00040	Ущелье Ак-суу , еловые леса, луговые альпийские почвы 2020 м.н.у.м.	187	7	4
KMI_00041	Северный берег Иссык-Куля, сельхоз. поле под вики, светло каштановые почвы, 1655 м.н.у.м.	42	3	1
KMI_00042	Северный берег Иссык-Куля, сельхоз. поле под гречихи, светло каштановые почвы, 1641 м.н.у.м.	99	10	7
KMI_00043	Северный берег Иссык-Куля, сельхоз. поле под пшеницы, светло каштановые почвы, 1649 м.н.у.м.	Н.о	н	н
KMI_00044	Северный берег Иссык-Куля, сельхоз. поле под картофеля, светло каштановые почвы, 1747 м.н.у.м.	Н.о	н	н
KMI_00045	Ущелье «Жети-Огуз»,еловые леса, луговые альпийские почвы, 2261 м.н.у.м.	216	4	3
KMI_00046	Ущелье «Жети-Огуз»,еловые леса, луговые альпийские почвы, 2298 м.н.у.м.	324	7	2
KMI_00047	Ущелье «Жети-Огуз»,еловые леса, луговые альпийские почвы , 2150	256	6	2



KMI_00048	м.н.у.м. Ущелье «Жети-Огуз», арчовые леса, темные лесные почвы, 2212 м.н.у.м.	238	12	6
KMI_00049	Ущелье «Жети-Огуз», арчовые леса, темные лесные почвы, 2210 м.н.у.м.	241	6	4
KMI_00050	Ущелье «Жети-Огуз», луговые альпийские , степные почвы, 2062 м.н.у.м.	135	10	5
KMI_00051	Тонский район ,предгорные степи, луговые темные солено-щелочные болотные почвы, 1629 м.н.у.м.	281	4	1
KMI_00052	Тонский район ,предгорные степи, луговые темные солено-щелочные болотные почвы, 1627 м.н.у.м.	223	3	1
	Общее количество штаммов 24165.1		94	58

Как показывают результаты исследований высокогорные луговые альпийские почвы, горные черноземно- лесные почвы, взятые из ущелья Ак-суу на высоте выше 2000 м.н.у. моря были богаты по количеству первичных колониобразующих единиц *Streptomyces* на питательной среде, а также по количеству новых антибиотик продуцирующих изолятов. Например из сайта КМІ_00036 из 291 колониобразующих единиц (КОЕ) после 1-го скрининга положительных было 8 изолятов, после 3-скрининга - 7, из сайта КМІ_00037 из 233 КОЕ после 1-го скрининга положительных было 8, после 3-скрининга - 7, из сайта КМІ_00039 – 5. Это свидетельствует о богатом численном содержании в этих почвах актиномицетов. Характерными особенностями этих почв, являющихся подходящей экологической нишей актиномицетов - они богаты гумусом, содержание которого в верхнем горизонте колеблется от 5 до 20% с постепенным уменьшением книзу. Они насыщены кальцием, который составляет 80-90% от суммы поглощенных оснований. Минерализация опади ели Шренка, зола которого богата кальцием, обуславливает нейтральную реакцию почвенного раствора, рН равен 7,0- 7,5.

Как известно в естественной среде комплексы актиномицетов поэтапно участвуют в разложении труднодоступных органических соединений в почве, занимая определенную пространственную и временную позицию в экосистеме. Высокая приспособляемость к различным условиям существования позволяет актиномицетам принимать участие в превращениях широкой группы веществ. Актиномицеты очень выносливы и могут развиваться при низкой влажности почв. Локальное развитие, значительное увеличение количества актиномицетов, а иногда и доминирование определенных их представителей наблюдается обычно тогда, когда создаются условия для использования сравнительно труднодоступных субстратов. Поэтому в горных почвах субальпийских и альпийских лугов, где содержание трудно разлагаемых соединений высокое, актиномицеты обнаруживаются в значительном количестве (до 5 млн. на 1г воздушно-сухой почвы), и они составляют 40-50% от всех микроорганизмов.

Почвы под сельскохозяйственными растениями отличались по содержанию в них биоразнообразия актиномицетов. Сайт КМІ_00042, представленный горными светло-каштановыми почвами, под горчицы был богат по содержанию антибиотик продуцирующих изолятов, так после третьего скрининга было получено 7 позитивных изолятов (рис1.). По –видимому корневые выделения или экссудаты этого растения

привлекают как источники питания для актиномицетов. Далее следует отметить именно эти изоляты отличались по интенсивности и эффективности проявленного ими антибиотического антагонизма в отношении штаммов *E.coli*, содержащие устойчивые к известным антибиотикам плазмиды. Зона лизиса вокруг этих штаммов был намного больше чем другие изоляты. Еще они обладают сильным запахом. Кроме того выделенный из под горчицы один изолят проявил сильный рост стимулирующий эффект на сельхозрастений. Тогда как, из почвенных образцов, взятых из картофельного и пшеничного полей не удалось выделить даже первичных колоний актиномицетов. Из образцов взятых из поля засеянные викией был выделен всего 1 изолят, положительный после вторичного скрининга.

Далее сайт КМІ_00048,(Жети- Огузское ущелье) представленный темными арчовыми лесами также были наиболее богаты актиномицетами. После третьего скрининга позитивных изолятов было 6. Еще один сайт из этого же ущелье КМІ_00050

(луговые альпийские почвы) отличался более менее богатым содержанием новых антибиотик продуцирующих изолятов.

Луговые темные солоно-щелочные болотные почвы были богато представлены видами актиномицетов, однако после скринингов, антибиотик содержащих новых штаммов оказалось мало, всего по одному.

Как показали исследования не все почв богаты по содержанию антибиотик продуцирующих изолятов актиномицетов. Следует отметить, что богатство почв актиномицетами не всегда сопровождается обилием антагонистов. Встречаются почвы, изобилующие актиномицетами и совершенно лишенные антагонистов, напротив, есть почвы, бедные актиномицетами, но относительно богатые формами с антибактериальными свойствами.

Использованный нами молекулярный подход, в частности экстракция ДНК непосредственно из почвы и ПЦР анализ позволил нам обнаружить присутствие в исследованных почвах неизвестных генов. Дегенерация ПЦР праймеров позволила нам амплифицировать гены бактерий, которые не были культивированы при традиционном методе. Большинство клинически важных антибиотиков в клетке актиномицетов были синтезированы с помощью полукетид синтетазой (PKS гены). Наши американские коллеги сумели вырождать ПЦР праймеров для PKS генов и амплифицировать их из экстрагированной из почвы ДНК, представленных нами [11]. Нами было сделано сравнение полученных из почвенных образцов Кыргызстана с данными всемирного Ген Банка (рис.2).



Рис.1. Картина при проведении скрининга колоний стрептомицетов через *E.coli* культуры содержащих резистентные к известным применяемым в лечебной практике антибиотикам плазмиды: А- колония *Streptomyces*, выделенная из ризосферы горчицы, В - колония *Streptomyces*, выделенная из темно- арчовых лесов которые проявили сильный антагонизм ((лизис вокруг зоны колоний) в отношении *E.coli*.

Как указано на рис. 2 цифры от 251 до 2515 означают место расположение полученных нами новых изолятов, которые в филогенетической дендрограмме близки к известным в Генбанке видам *Streptomyces avermitilis* и 73% из них имеют ген полукетид синтетаза, ответственный за синтез антибиотиков типа макролидов. Цифры от 255 до 25521 означают место расположение полученных нами новых изолятов, которые в филогенетической дендрограмме близки к известным в Генбанке видам *Streptomyces rochei* и 80% из них имеют ген полукетид синтетаза, ответственный за синтез антибиотиков типа макролидов.

Таким образом, 3889 колония образующие единицы актиномицетов прошли скрининг через *E.coli* культуры содержащие резистентные к известным применяемым в лечебной практике антибиотикам плазмиды, в результате было получено 54 изолятов продуцирующих потенциально новые антибиотики, имеющих применение в фармакологии как источники новых лекарственных препаратов. В результате молекулярного скрининга с помощью полукетид синтетаза праймеров были обнаружены новые PKS гены в почвах Иссык-Кульской области. Были созданы космид библиотеки PKS генов, полученных из почв Иссык-Кульской области.

Индекс Шеннона по оценке биоразнообразия стрептомицетов в различных типах почв Иссык-Кульской был сравнительно высок и равнялся к $H' = 6,72$, а индекс Симпсона был $S_1^* = 2,13$, указывающий степень богатства доминирующих видов. Количество доминирующих видов в отдельных типах почв значительно высок, а в других типах почв некоторые виды обнаруживались только один раз.

В целом, как показали наши исследования почвы Иссык-Кульской области были богаты на содержание актиномицетов рода *Streptomyces*, среди них 54 изоляты были идентифицированы как продуценты новых антибиотиков, имеющих значение в разных отраслях биотехнологии.

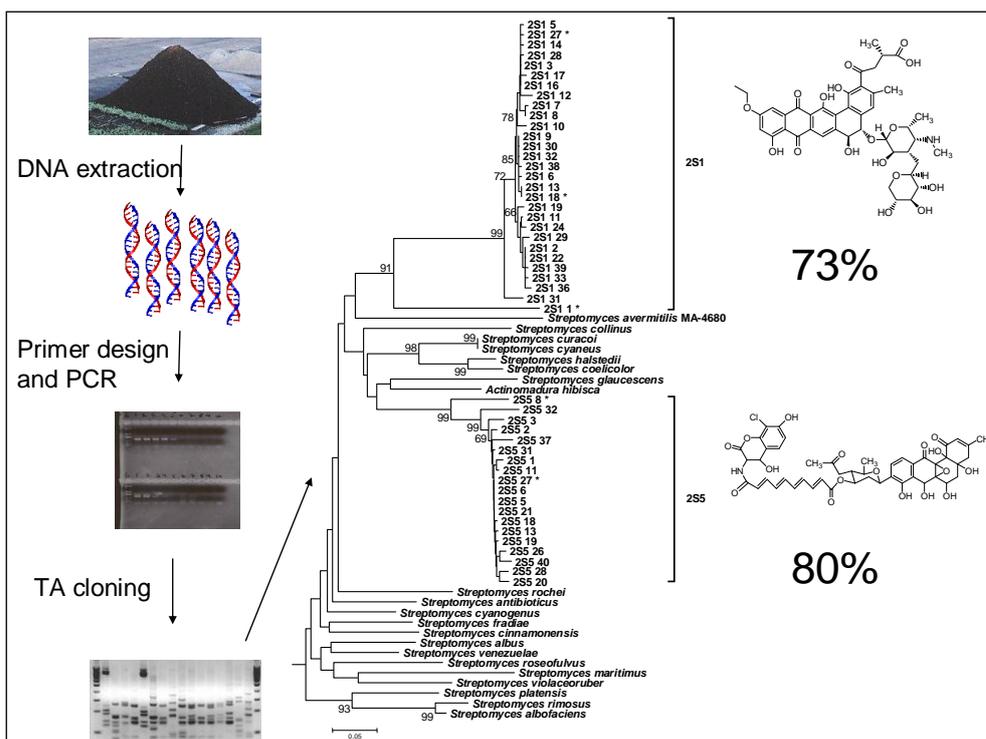


Рис. 2. Схема доступа химического разнообразия клетки новых видов актиномицетов и их филогенетическое дерево в генбанке прокариотов.

REFERENCES

1. Borodina Irina, Scholler C., Eliasson A., Nielsen J. 2005. Metabolic Network Analysis of *Streptomyces tenebrarius*, a *Streptomyces* Species with an Active Entner-Doudoroff Pathway. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, May, p. 2294–2302.
2. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А.. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*// М.:Наука, 1983 г.
3. Doolotkeldieva. T. ,Totubaeva.N. 2009. New Strains of *Streptomyces* as Producers of Biofungicides and Biological Stimulators for Protection of the Shoots and Seedlings of Tiang-Shang Spruce Fir (*Picea Schrenkiana*)..J.Microbiology Insights:2,1-13, Labertas Academica , New Zealand.
4. Doolotkeldieva, T., Totubaeva.N. Biodiversity of *Streptomyces* of high-mountainous ecosystems of Kyrgyzstan and its' biotechnological potential. // Journal Antonie van Leeuwenhoek (2006) 00:1-4.
5. Dunbar et al., AEM No. 4, Vol 65, 1999, pp. 1662-69.
6. Егоров Н.С.1986.Основы учения об антибиотиках. Москва, «Высшая Школа».
7. Краткий определитель бактерий Берги \ Под ред.Хоуст Дж., М., Мир, 2004, 500с.
8. Kieser, T.,M. J. Bibb,M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood. 2000. General introduction to actinomycete biology, p. 1–42. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
9. Тотубаева. Н.Э. , Доолоткельдиева Т.Д., . 2004. Биологическая эффективность новых штаммов *Streptomyces* для стимуляции роста сеянцев хвойных пород. В сбор. «Исследование живой природы БИП НАН КР
10. Stark, W. M., N. G. Knox, and R. M. Wilgus. 1971. Strains of *Streptomyces tenebrarius* and biosynthesis of nebramycin. Folia Microbiol. (Prague) 16:205–217.
11. Wawrik, B., G. Zylstra, L. Kerkhof and J. Kukor. 2005. Identification of Unique Type II Polyketide Synthase Genes in Soil. Appl. Env. Microbiol. 2005 (5), p. 2232–2238
12. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
13. Hill TC, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. FEMS Microbiology Ecology 43:1-1