

УДК 615.331

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-АНТАГОНИСТОВ ИЗ ПОЧВЫ И ВОДОЕМОВ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Д.Д. Белова, ведущий инженер научно-образовательного центра, тел. 8(9609) 03-62-81, antonina-daria@mail.ru;

С.А. Сухих, кандидат технических наук, доцент, тел. 8(9609) 03-62-81, stas-asp@mail.ru;

И.С. Милентьева, кандидат технических наук, доцент, тел. 8(9609) 03-62-81, irazumnikova@mail.ru

ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет

Ключевые слова: *антибиотикорезистентность, бактериоцины, бактерии, фенотипические свойства*

Был проведен поиск и идентификация новых микроорганизмов районов Кемеровской области, обладающих антагонистической активностью. Анализ выявил в анализируемых образцах микроорганизмы родов: Bacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Lactobacillus, Bacteroides.

Работа выполнена в рамках исполнения Соглашения № 075-02-2018-1934 от 20.12.2018 года (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI57418X0207) по теме: «Получение фармацевтических субстанций на основе микроорганизмов антагонистов, выделенных из природных источников», заключенным между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации и Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Кемеровский государственный университет».

Введение. Поиск новых антимикробных препаратов с широким спектром действия и меньшим уровнем развития к ним микробной резистентности имеет как научное, так и практическое значение. За последние несколько лет в медицинских учреждениях было выделено множество микроорганизмов различных видов, на которых не действуют традиционные антибиотики [1,2]. В этой связи поиск новых антимикробных препаратов с широким спектром действия и меньшим уровнем развития к ним микробной резистентности имеет как научное, так и практическое значение.

Внимание исследователей уже несколько десятилетий привлечено к антимикробным пептидам – бактериоцинам, которые продуцируются преимущественно грамположительными бактериями [3]. Бактериоцины и бактериоциноподобные вещества – это комплексные

вещества, обладающие антибактериальными свойствами, субстанции белковой природы [3,4,6], различающиеся по спектру активности, способу действия, генетическому контролю, биохимическим свойствам [5,6]. Широкое применение бактериоцины получили по ряду причин. Во-первых, они не токсичны, а, во-вторых, у бактерий не развивается по отношению к ним резистентность [3,7]. Молочнокислые микроорганизмы на сегодняшний день являются наиболее перспективными продуцентами бактериоцинов и бактериоциноподобных веществ [4,7].

Практическое использование бактериоцинов не заканчивается лечением инфекционных заболеваний. Они также находят применение как биоконсерванты кормовых и пищевых продуктов [8]. Бактериоцин низин является одним из наиболее изученных и разрешен для использования в качестве биологического консерванта (код E234). Принцип действия бактериоцина низина, являющимся мембранотропным полипептидом, основан на подавлении роста бактерий путем нарушения образования мембранного потенциала [8,9].

Основываясь на вышесказанном можно сказать, что решить проблему с профилактикой и лечением большинства инфекционных заболеваний может помочь создание новых штаммов молочнокислых микроорганизмов с антибактериальной и фунгицидной активностью [4,7]. Так, например, на сегодняшний день полностью изучены фунгицидные вещества, синтезируемые бактериями рода *Lactobacillus*. В то время как у бактерий рода *Lactococcus* фунгицидная активность считается достаточно редким случаем и практически не изучена, что не позволяет сделать достоверных выводов о синтезе фунгицидных веществ [10].

В этой связи выделение, изучение свойств и синтеза новых антибактериальных и фунгицидных антибиотиков, образуемых молочнокислыми бактериями и другими микроорганизмами-антагонистами, а также исследование перспективы их применения в фармацевтической промышленности имеет фундаментальный и практический интерес.

Данная работа посвящена поиску и идентификации новых микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью по отношению к патогенным бактериям и грибкам.

Материалы и методы исследований. Материалом для выделения микроорганизмов послужили почва, водоемы и растительные объекты различных муниципальных районов Кемеровской области: Кемеровского, Прокопьевского, Мариинского, Яйского, Гурьевского.

Отбор проб почв производили в 3-х повторностях. Пробы отбирали в шахматном порядке, по диагонали, методом конверта на опре-

Таблица 1 – Морфологические свойства изолятов, выделенных из почв, водоемов и растительных объектов Кемеровской области

Изолят	Показатель			
	Спорообразование	Подвижность	Форма	Окраска по Граму
№1	–	+	палочкообразная	грамотрицательная
№2	–	+	дрожжеподобные грибки	–
№3	+	–	дрожжеподобные грибки	грамположительная
№4	+	+	палочкообразная	грамположительная
№5	–	–	дрожжеподобные грибки	–
№6	+	–	сферическая	грамположительная
№7	+	+	палочкообразная	грамположительная
№8	–	–	сферическая	грамположительная
№9	+	+	сферическая	грамположительная
№10	–	–	сферическая	грамположительная
№11	–	–	сферическая	грамположительная
№12	–	–	палочкообразная	грамположительная
№13	–	–	палочкообразная	грамположительная
№14	–	+	палочкообразная	грамотрицательная
№15	–	+	палочкообразная	грамотрицательная
№16	–	–	сферическая	грамположительная
№17	–	+	палочкообразная	грамотрицательная
№18	+	–	палочкообразная	грамположительная
№19	+	+	палочкообразная	грамположительная

Таблица 2 – Фенотипические свойства изолятов, выделенных из почв, водоемов и растительных объектов Кемеровской области

Изолят	Показатель						
	Контур края	Профиль	Поверхность	Цвет	Структура	Консистенция	Прозрачность
№1	Ровный	Плоский	Гладкая	Светло-желтый	Однородная	Плотная	Прозрачная
№2	Ровный	Волнистый	Мелкоморщинистая	Белый	Однородная	Плотная	Матовая
№3	Неровный	Выпуклый	Ворсинистая	От белого до буро-зеленого	Неоднородная	Плотная	Матовая
№4	Неровный	Выпуклый	Гладкая	Серовато-белый	Неоднородная	Вязкая	Матовая
№5	Ровный	Волнистый	Бороздчатая	Серовато-белый	Неоднородная	Плотная	Матовая
№6	Неровный	Волнистый	Мелкоморщинистая	От белого до кремового	Однородная	Плотная	Матовая
№7	Неровный	Плоский	Гладкая	Серовато-белый	Неоднородная	Вязкая	Матовая
№8	Ровный	Выпуклый	Гладкая	Серый	Однородная	Мягкая	Прозрачная
№9	Неровный	Выпуклый	Гладкая	Белый	Однородная	Мягкая	Прозрачная
№10	Ровный	Выпуклый	Гладкая	Оранжево-зеленый	Зернистая	Плотная	Матовая
№11	Ровный	Выпуклый	Шероховатая	Телесный	Однородная	Плотная	Матовая
№12	Ровный	Плоский	Гладкая	Белый	Однородная	Плотная	Матовая
№13	Ровный	Плоский	Гладкая	Белый	Однородная	Плотная	Матовая
№14	Ровный	Выпуклый	Шероховатая	Серо-белый	Зернистая	Плотная	Полупрозрачная
№15	Ровный	Выпуклый	Складчатая	Серо-белый	Однородная	Мягкая	Матовая
№16	Неровный	Выпуклый	Шероховатая	Телесный	Однородная	Мягкая	Матовая
№17	Ровный	Плоский	Мелкозернистая	Желтоватый	Однородная	Плотная	Прозрачная
№18	Ровный	Плоский	Блестящая	Кремовый	Зернистая	Мягкая	Матовая
№19	Ровный	Выпуклый	Блестящая	Белый	Однородная	Пастообразная	Полупрозрачная

деленной глубине или по горизонтам. Для отбора почвенных проб использовали лопату, совок, нож и почвенный бур. Каждый предмет перед взятием отдельной пробы тщательно очищали, протирали ватным тампоном со спиртом и обжигали. Образцы отбирали в стерильную бумагу Крафта.

Выделение штаммов из образцов почв проводили по стандартным методикам, описанным в «Методах микробиологического контроля почвы. Методические рекомендации» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 24.12.2004 № ФЦ/4022), а также Практикумом по биологии почв под редакцией Г.М. Зеновой.

Бактериальные культуры микроорганизмов выращивали в течение 48 ч на плотных питательных средах следующего состава:

- ГРМ агар, г/л: кислотный гидролизат рыбной муки – 20,0; глюкоза – 10,0; агар-агар – 15,0;

- Мясопептонный агар (МПА), г/л: пептон сухой ферментативный – 10,0; экстракт мясной – 11,0; NaCl – 5,0; агар-агар – 15,0, глюкоза – 10,0; вода дистиллированная.

Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили с использованием методов, предложенных в определителе бактерий Берги и в монографии О.А. Нестеренко и соавт. Мазки окрашивали по Граму.

Культурально-морфологические свойства изолятов изучали с помощью общепринятых микробиологических методов – фиксировали цвет, размер, консистенцию колоний на плотной среде, проводили окрашивание мазков по Граму, оценивали подвижность клеток в препарате «раздавленная капля».

Результаты исследований и их обсуждение. В результате проведенных исследований из почв, водоемов и растительных объектов Кемеровской области выделено 19 изолятов, различных по морфологическим (таблица 1) и фенотипическим признакам (таблица 2), предположительно обладающих антибактериальной активностью.

Предварительный анализ по фенотипическим и морфологическим признакам позволяет предположить наличие в анализируемых образцах микроорганизмов следующих родов: *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*.

Библиографический список:

1. Folgori, L. Future Challenges in Pediatric and Neonatal Sepsis: Emerging Pathogens and Antimicrobial Resistance / Folgori L., Bielicki J. // Journal of pediatric intensive care. – 2019. - Vol. 8. - №1. - P. 17-24.

2. Holst, J. Global Health Comprises More than Health Security: Discussion / Holst J., Razum O. // Gesundheitswesen. – 2018. - Vol. 80. - №10. - P. 923-926.
3. Potential applications of lactic acid bacteria and bacteriocins in anti-mycobacterial therapy / Sivaraj A., Sundar R., Manikkam R. et al. // Asian pacific journal of tropical medicine. – 2018. - Vol. 11. - №8. - P. 453-459.
4. Peptide Bacteriocins - Structure Activity Relationships / Etayash H., Azmi S., Dangeti R. et al // Current topics in medicinal chemistry. – 2016. - Vol. 16. - №2. - P. 220-241.
5. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400 / C. Gaspar, G.G. Donders, R. Palmeira-de-Oliveira, et. al. / AMB express. – 2018. – Vol. 8. – Article number 153.
6. Lim, E.-S. Purification and characterization of two bacteriocins from *Lactobacillus brevis* BK11 and *Enterococcus faecalis* BK61 showing anti-*Helicobacter pylori* activity / E.-S. Lim // Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. – 2015. – Vol. 58 (5). – P. 709-714.
7. Screening, purification and characterization of thermostable, protease resistant Bacteriocin active against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / A. Ansari, R.R..Zohra,; O.M. Tarar, et al. // BMC Microbiology. – 2018. – Vol. 18. – Article number 192.
8. Immonen, N. Bioluminescence-based bioassays for rapid detection of nisin in food / N. Im-monen, M. Karp // Biosens Bioelectron. – 2007. – № 22. – P. 65-77.
9. Isolation of two lactobacilli, producers of two new bacteriocin-like substances (BLS) for po-tential food-preservative use / I. Anacarso, L. Gigli, M. Bondi, et. al. // European Food Re-search and Technology. – 2017. – Vol. 243 (12). – P. 2127-2134.
10. Functional analysis of the biosynthetic gene cluster required for immunity and secretion of a novel *Lactococcus*-specific bacteriocin, lactococcin Z / G.M. Daba, N. Ishibashi, T. Zendo, et. al. // Journal of Applied Microbiology. – 2017. – Vol. 123 (5). – P. 1124-1132.

ISOLATION OF ANTAGONISTIC MICROORGANISMS FROM SOIL AND WATER SOURCES OF KEMEROVO REGION

Belova D., Sukhikh S.A., Milentyeva I.S.

Key words: *antibiotic resistance, bacteriocin, antagonism, bacteria, phenotypic properties.*

A search and identification of new microorganisms in areas of the Kemerovo region with antagonistic activity was carried out. Analysis revealed microorganisms of the genera: Bacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Lactobacillus, Bacteroides.