

Хассан Г.О.О., Ягудина И.Р., Карамова Н.С.  
Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия  
E-mail: gamal\_micro84@yahoo.com

## АНТИМИКРОБНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭНДОФИТНЫХ АКТИНОБАКТЕРИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Быстро растущие темпы антибиотикорезистентности микроорганизмов, возбудителей различных инфекционных заболеваний человека, обуславливают необходимость поиска новых природных источников эффективных антимикробных соединений.

Представлены результаты выделения эндофитных актинобактерий из двенадцати лекарственных растений, произрастающих в Республике Татарстан, и оценки их антимикробной активности в отношении пяти видов грамположительных бактерий, ассоциированных с инфекциями дыхательных путей (ИДП). Из корней, стеблей и листьев растений было выделено 68 изолятов актинобактерий, причем основное количество эндофитов содержалось в корнях (38,24%) а наименьшее количество – в листьях (29,41%) исследованных растений. Показано, что 14 изолятов проявляют антимикробный эффект в отношении *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium striatum*, *Bacillus subtilis*, изолированных из респираторного тракта пациентов с симптомами ИДП Университетской клиники Нового Касра, Аль-Айни и клиники Аль-Рахма (Египет). Самое большое количество изолятов эндофитных актинобактерий, обладающих антимикробной активностью, выделено из корней *Achillea millefolium*, причем изолят 8R7 ингибировал рост всех тестерных бактерий. Наивысший антибактериальный эффект показан для изолятов 8R7, 5R1 (из корней *Mentha piperita*) и 6R1 (из корней *Hypericum perforatum*) – диаметры зон ингибирования роста *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* и *Corynebacterium striatum* составили 18,3 мм, 18,0 мм и 17,5 мм соответственно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего исследования вторичных метаболитов эндофитных актинобактерий, выделенных из корней *Mentha piperita*, *Hypericum perforatum* и *Achillea millefolium*, с целью разработки новых препаратов для лечения инфекций дыхательных путей.

**Ключевые слова:** эндофитные актинобактерии, антимикробная активность, респираторные инфекции, лекарственные растения.

Эндофиты – микроорганизмы (бактерии, грибы, протисты), которые способны проникать во внутренние ткани растений и проводить в данной среде хотя бы часть своего жизненного цикла [1]. В последние десятилетия уделяется большое внимание исследованию роли эндофитных микроорганизмов в жизнедеятельности растений. Анализ имеющихся на сегодняшний день данных литературы показывает, что большинство эндофитов классифицируются как комменсалы с неизвестными пока функциями в отношении своих хозяев, а меньшая часть – как оказывающие положительное (мутуализм) или же отрицательное (антагонизм) влияние на жизнь растений [2]. Исследование эндофитных микроорганизмов, положительно влияющих на рост и развитие растений, механизмов ростостимулирующего эффекта, а также антагонистического действия эндофитов в отношении возбудителей болезней, позволит разработать безопасные биопрепараты для регуляции роста культурных растений и эффективного биоконтроля фитопатогенов

[3], [4]. Кроме того, особый интерес представляют эндофитные микроорганизмы, в первую очередь, актинобактерии, синтезирующие разнообразные биологические активные вещества, которые могут быть использованы для лечения различных заболеваний человека [5], [6]. Актуальность поиска эффективных природных соединений для создания новых медицинских препаратов обусловлена, прежде всего, быстро растущими темпами антибиотикорезистентности микроорганизмов, возбудителей различных инфекционных заболеваний человека.

Целью настоящей работы явилась оценка антимикробного потенциала эндофитных актинобактерий, выделенных из лекарственных растений, в отношении грамположительных бактерий, ассоциированных с респираторными инфекциями.

### Материалы и методы

В работе использовано 12 видов лекарственных растений, собранных в июле 2016 г., в Республике Татарстан. Эндофитные микро-

организмы выделены из разных частей растений (корни, стебли, листья) руководствуясь методическими рекомендациями, представленными в работах Anjump and Chandra [7], Passari et al. [8]. Для стерилизации поверхностных покровов отдельные кусочки, предварительно промытых проточной водопроводной водой растений, помещали последовательно в 0,1% раствор Tween 20, 70% раствор этанола, 5% раствор гипохлорита натрия, 70% раствор этанола, стерильную дистиллированную воду. Для контроля стерилизации поверхностных покровов растений 100 мкл дистиллированной воды после последнего промывания кусочков растений, высевали на поверхность LB-агара. Для выделения эндофитных актинобактерий, простерилизованные кусочки растений раскладывали на среду Гаузе [9] с добавлением нистатина (30 мкг/мл) и бихромата калия (30 мкг/мл) в чашках Петри, которые затем инкубировали в течение 7–14 дней при 28°C. Колонии микроорганизмов, выросших вокруг кусочков растений, многократно пересевали на среду Гаузе для получения чистых культур. Первичную идентификацию актинобактерий проводили по морфологическим характеристикам выделенных изолятов (визуальная оценка колоний, цвет воздушного и субстратного мицелия, цвет пигмента, выделяемого в питательную среду, окраска по Граму). Антимикробный потенциал выделенных изолятов оценивали, сравнивая зоны задержки тестерных микроорганизмов в присутствии агарового блока с актинобактериями (диаметр = 7 мм) [10], с таковым в контроле (в отсутствие актинобактерий). В качестве тестерных микроорганизмов использованы 5 видов грамположительных бактерий, выделенных из респираторного тракта пациентов с симптомами инфекции дыхательных путей (ИДП) в Университетской клинике Нового Касра, Аль-Айни и клинике Аль-Рахма (Египет). Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам с использованием программы Microsoft Excel.

### Результаты и обсуждение

Из 12 видов лекарственных растений нами выделено 68 изолятов эндофитных микроорганизмов. Все изоляты, при росте на агаризованной среде Гаузе, образовывали типичные для

актиномицетов плотные, кожистые колонии, срастающиеся со средой, а также характерные воздушный и субстратный мицелий. Некоторые изоляты выделяли в среду пигменты. Клетки всех изолятов окрашивались грамположительно. Таким образом, морфологическая характеристика выделенных изолятов позволила нам предварительно идентифицировать их как актиномицеты. Как видно из таблицы 1, самое большое количество изолятов эндофитных актинобактерий выделено из растений тысячелистник обыкновенный (11), а также мята перечная (10).

Установлено, что эндофитные актинобактерии предпочтительней всего колонизируют корни растений. Исключение составили растения календула лекарственная, полынь горькая и цикорий обыкновенный, у которых, по количеству эндофитных актинобактерий, доминировали листья. В целом, основное количество эндофитных актинобактерий содержится в корнях (38,24%) а наименьшее количество – в листьях (29,41%) исследованных растений (см. табл. 1, рис. 1). Результаты о количественном соотношении эндофитных актинобактерий в разных органах растений подтверждают данные, полученные другими авторами при изучении эндофитной микрофлоры растений Таиланда [11], Китая [12], Индии [13].

Инфекции дыхательных путей являются причиной 10% общей заболеваемости и смертности во всем мире [14]. В настоящее время существенную роль в этиологии респираторных заболеваний играют условно-патогенные микроорганизмы различных таксономических групп. Поиск новых природных агентов для эффективной и безопасной терапии ИДП является актуальной проблемой современной медицины.

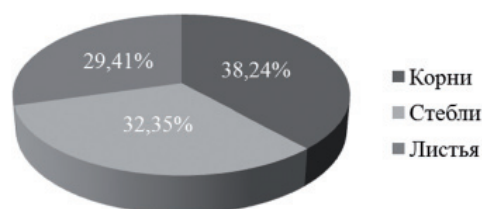


Рисунок 1 – Встречаемость эндофитных актинобактерий в различных частях 12 лекарственных растений Республики Татарстан

Таблица 1 – Встречаемость эндофитных актинобактерий в лекарственных растениях Республики Татарстан

№ п/п	Растение	Количество изолятов актинобактерий, выделенных из разных частей растений			
		Корни (R)	Стебли (S)	Листья (L)	Всего
1	Календула лекарственная <i>Calendula officinalis</i> L.	1	2	2	5
2	Чистотел большой <i>Chelidonium majus</i> L.	1	1	1	3
3	Крапива двудомная <i>Urtica dioica</i> L.	1	1	1	3
4	Подорожник большой <i>Plantago major</i> L.	3	2	1	6
5	Мята перечная <i>Mentha piperita</i> L.	5	3	2	10
6	Зверобой продырявленный <i>Hypericum perforatum</i> L.	3	2	1	6
7	Полынь горькая <i>Artemisia absinthium</i> L.	1	1	5	7
8	Тысячелистник обыкновенный <i>Achillea millefolium</i> L.	5	5	1	11
9	Ромашка аптечная <i>Matricaria recutita</i> L.	2	1	1	4
10	Цикорий обыкновенный <i>Cichorium intybus</i> L.	1	2	3	6
11	Донник белый Medic. <i>Melilotus albus</i>	2	1	1	4
12	Пижма обыкновенная <i>Tanacetum vulgare</i> L.	1	1	1	3
13	Итого	26	22	20	68

Таблица 2 – Антимикробный потенциал изолятов эндофитных актинобактерий 12 лекарственных растений Республики Татарстан в отношении грамположительных бактерий, ассоциированных с респираторными инфекциями

Изоляты актинобактерий	Зона ингибирования роста тестерных микроорганизмов, мм				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>
5S3	0	0	0	12,0±0,8	13,2±0,7
5R1	0	0	0	18,3±0,4	13,0±0,9
5R4	12,4±0,7	0	0	11,2±0,3	11,3±0,5
6S1	0	0	0	11,0±0,5	0
6S2	0	0	0	10,4±0,3	0
6R1	16,2±0,9	0	14,0±0,8	16,0±0,5	17,5±0,7
7L1	0	8,5±0,9	0	10,3±0,6	
7L2	0		0	0	9,5±0,3
8R1A	0	12,3±0,4	0	0	0
8R1B	0	0	0	11,5±0,5	0
8R2	0	13,0±0,5	0	0	0
8R7	11,2±0,4	10,2±0,6	18,0±0,9	15,0±0,4	11,2±0,4
8R10	9,3±0,3	0	13,0±0,9	11,4±0,3	0
10L	10,3±0,5	0		0	0

В настоящей работе мы исследовали антимикробную активность эндофитных актинобактерий 12 лекарственных растений, в отношении 5 видов грамположительных бактерий, выделенных из респираторного тракта пациентов с симптомами ИДП в Университетской клинике Нового Касра, Аль-Айни и клинике Аль-Рахма (Египет). Из 68 изолятов актинобактерий, антибактериальным потенциалом обладали 14 (см. табл. 2), причем большинство из них (8 изолятов) было выделено из корней растений. Зоны ингибирования роста тестерных бактерий при действии разных изолятов актинобактерий варьировали от 8,5 мм до 18,3 мм. Самое большое количество активных актинобактерий (5 изолятов) выделено из корней тысячелистника обыкновенного, причем изолят 8R7 оказывал антибактериальное действие в отношении всех тестерных бактерий. Изолят 6R1, выделенный из корней зверобоя продырявленного, подавлял рост четырех видов тестерных бактерий: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium striatum*. Изоляты 5R4 (из корней мяты перечной) и 8R10 (из корней тысячелистника обыкновенного) оказывали ингибирующее действие на 3 вида бактерий: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium striatum* и *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* соответственно.

Представители типа *Actinobacteria* по способности синтезировать биологически активные соединения, в том числе и антибиотики, являются непревзойденными лидерами среди прокариот [15]. В последнее десятилетие особый интерес привлекают эндофитные актиномицеты лекарственных растений, как источник

уникальных антимикробных соединений [8], [16]. Показано, что эндофитные стрептомицеты, изолированные из растений Верхней Амазонии и Северной территории Австралии, продуцируют новые пептидные антибиотики мунумбицины, эффективные в отношении *Bacillus anthracis* и *Mycobacterium tuberculosis* [17], [18]. Антибиотик какадумидин демонстрировал значительную активность против *Bacillus anthracis* [19], а коронамидин в отношении *Cryptococcus neoformans* [20] в очень низких концентрациях. Несколько уникальных антибиотиков, например, лариантины, ингибирующие рост *Mycobacterium tuberculosis* [21], актинохивин, проявивший анти-ВИЧ активность [22], мангромицины с антирипаносомной активностью [23], были получены из эндофитных актинобактерий японскими учеными.

Итак, из 68 изолятов эндофитных актинобактерий, выделенных нами из 12 лекарственных растений, произрастающих на территории Республики Татарстан, наивысшую антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий из респираторного тракта пациентов с симптомами ИДП, показали 3 изолята: 8R7 (выделен из корней тысячелистника обыкновенного), 5R1 (выделен из корней мяты перечной) и 6R1 (выделен из корней зверобоя продырявленного). Дальнейшее, более детальное изучение антимикробного эффекта и идентификация соединений, ответственных за биологические эффекты исследованных эндофитных актинобактерий, позволят оценить перспективность использования их вторичных метаболитов для разработки новых препаратов для лечения респираторных инфекций.

05.10.2017

**Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной  
в рамках государственной поддержки**

**Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения  
его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров**

#### Список литературы:

1. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes / P.R. Hardoim, L.S. van Overbeek, G. Berg [et al] // Microbiology and Molecular Biology Reviews. - 2015. - Vol. 79. - No. 3. - P. 293-320.
2. Bacterial endophytes in agricultural crops / J. Hallmann, A. Quadt-Hallmann, W.F. Mahaffee [et al] // Canadian Journal of Microbiology. - 1997. - Vol. 43. - P. 895-914.

3. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам / И.В. Максимов, С.В. Веселова, Т.В. Нужная [и др.] // Физиология растений. – 2015. – Т. 62. – № 6. – С. 763–775.
4. Эндобитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие / В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 5. – С. 648–654.
5. Bacterial endophytes: recent developments and applications / K.P. Ryan, K. Germaine, A. Franks [et al] // FEMS Microbiology Letters. – 2008. – Vol. 278. – P. 1–9.
6. Matsumoto, A. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds / A. Matsumoto, Y. Takahashi // The Journal of Antibiotics. – 2017. – Vol. 70. – P. 514–519.
7. Anjum, N. Endophytic bacteria: optimization of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization / N. Anjum, R. Chandra // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. – 2015. – Vol. 8. – P. 233–238.
8. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential / A.K. Passari, V.K. Mishra, R. Saikia [et al] // Frontiers in Microbiology. – 2015. – No. 6. – P. 1–13.
9. Егоров, Н.С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ, 1957. – 78 с.
10. Nedialkova, D. Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica / D. Nedialkova, M. Naidenova // Journal of Culture Collections. – 2005. – Vol. 4. – P. 29–35.
11. Taechowisan, T. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity / T. Taechowisan, J.F. Peberdy, S. Lumyong // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2003. – Vol. 19. – P. 381–385.
12. Glycomyces scopariae sp. nov. and Glycomyces mayteni sp. nov., isolated from two medicinal plants in China / S. Qin, H.H. Chen, H.P. Klenk [et al] // Int J Syst Evol Microbiol. – 2009. – Vol. 59. – P. 1023–1027.
13. Antimicrobial biosynthetic potential and genetic diversity of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants / A. Gohain, A. Gogoi, R. Debnath [et al] // FEMS Microbiology Letters. – 2015. – Vol. 362. – No. 19. – fmv158. – doi: 10.1093/femsle/fmv158.
14. Jacobs, E. Susceptibility patterns of bacterial isolates from hospitalised patients with respiratory tract infections (MOXIАКТIV Study) / E. Jacobs, A. Dalhoff, G. Korfmann // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2009. – Vol. 33. – P. 52–58.
15. Berdy, J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading / J. Berdy // The Journal of Antibiotics. – 2012. – Vol. 65. – P. 385–395.
16. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity / P. Golinska, M. Wypij, G. Agarkar [et al] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2015. – Vol. 108. – P. 267–289.
17. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by Streptomyces NRRL 30562, endophytic on Kennedia nigricans / U.F. Castillo, G.A. Strobel, E.J. Ford [et al] // Microbiology. – 2002. – Vol. 148. – P. 2675–2685.
18. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from Streptomyces NRRL3052 / U.F. Castillo, G.A. Strobel, K. Mullenberg [et al] // FEMS Microbiology Letters. – 2006. – Vol. 255. – P. 296–300.
19. Kakadumycins, novel antibiotics from Streptomyces sp. NRRL 30566, an endophyte of Grevillea pteridifolia / U.F. Castillo, J.K. Harper, G.A. Strobel [et al] // FEMS Microbiology Letters. – 2003. – Vol. 234. – P. 183–190.
20. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate Streptomyces sp. (MSU-2110) endophytic on Monstera sp. / D. Ezra, U.F. Castillo, G.A. Strobel [et al] // Microbiology. – 2004. – Vol. 150. – P. 785–793.
21. Lariatins, novel anti-mycobacterial peptides with a lasso structure, produced by Rhodococcus Jostii K01-B0171 / M. Iwatsuki, R. Uchida, Y. Takakusagi [et al] // The Journal of Antibiotics. – 2007. – Vol. 60. – No. 6. – P. 357–363.
22. Actinohivin, a novel anti-HIV protein from an actinomycete that inhibits syncytium formation: isolation, characterization, and biological activities / H. Chiba, J. Inokoshi, H. Nakashima [et al] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2001. – Vol. 282. – P. 595–601.
23. Mangromicins A and B: structure and antitrypanosomal activity of two new cyclopentadecane compounds from Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216 / T. Nakashima, Y. Kamiya, M. Iwatsuki [et al] // The Journal of Antibiotics. – 2014. – Vol. 67. – P. 253–260.

**Сведения об авторах:**

**Хассан Г.О.О.**, аспирант кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета  
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, тел. +7(843) 337884 e-mail: gamal\_micro84@yahoo.com

**Ягудина И.Р.**, студент кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета  
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, тел. +7(843) 337884 e-mail: ilyuza.yagudina@mail.ru

**Карамова Н.С.**, доцент кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, кандидат биологических наук, доцент  
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, тел. +7(843) 337884 e-mail: nskaramova@mail.ru