



ORIGINAL ARTICLE

Culturable Actinobacteria Associated with Baikal Algae: Diversity and Antimicrobial Activity

Axenov-Gribanov D.V.^{1,2*}, Kostka D.V.¹, Protasov E.S.^{1,2},
Emshanova V.A.¹, Vereshchagina K.P.^{1,2}, Krasnova M.E.¹,
Gorbenko I.V.¹, Lubyaga Y.A.^{1,2}, Voycehovskaya I.V.¹,
Timofeyev M.A.¹

¹ Institute of Biology at Irkutsk State University, Irkutsk, 3 Lenin str., Russia

² Baikal Research Centre, Irkutsk, 21 Lenin str., Russia

*E-Mail: denis.axengri@gmail.com

Received June 10, 2018

The aim of the study was to assess the biodiversity of culturable strains of actinobacteria isolated from freshwater Baikal algae *Draparnaldioides baicalensis* and to assess the antimicrobial activity of compounds against Gram-positive bacteria. In the course of this study, we isolated both widespread strains of the genus *Streptomyces*, and rare representatives of the genus *Saccharopolyspora*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus* and *Micromonospora*. We demonstrated that the strains produce natural products with antimicrobial activity. Considering the large number of rare and active strains associated with the endemic algae *D. baicalensis*, we shown that these microorganisms have a value for biomedical and biotechnological development and to discovery of new natural compounds, including antibiotics.

Key words: Baikal, algae, endemics, natural products, antimicrobial activity, B. subtilis

Поиск, синтез и производство биологически активных соединений, и, в первую очередь, веществ с антибиотическими свойствами, является важнейшим направлением современных научных исследований как для российской, так и мировой науки. Необходимость разработки новых препаратов обусловлена стремительным ростом множественной резистентности микроорганизмов к ранее внедренным в медицинскую и клиническую практику антибиотикам (Jenke-Kodama & Dittmann, 2009).

Однако, процесс поиска и разработки новых биологически активных соединений осложняется тем, что большинство экосистем и микроорганизмов-продуцентов антибиотиков либо уже проанализированы, либо активно исследуются. Это приводит к тому, что вероятность обнаружения новых биологически активных веществ и продуцентов в таких изученных сообществах мала (Tiwari & Gupta, 2012). Поскольку методы получения новых антибиотиков с помощью химической модификации уже известных антибактериальных соединений имеют естественные ограничения, особый интерес представляет поиск и разработка новых биологически активных соединений из специфических симбионтных микроорганизмов, населяющих экосистемы с особыми эволюционными и экологическими характеристиками. Одним из наиболее перспективных мест поиска новых микроорганизмов является уникальная экосистема древнего озера Байкал и ее криофильные обитатели.

Важную роль для биотехнологии представляют симбионтные штаммы актинобактерий, поскольку данные микроорганизмы являются продуктивными источниками новых биологически активных соединений (Timoshkin *et al.*, 2001). Целью исследования являлась оценка биоразнообразия культивируемых штаммов актинобактерий, выделенных из пресноводной байкальской водоросли *Draparnaldioides baicalensis* и определение антимикробной активности синтезируемых соединений против некоторых модельных штаммов грамположительных бактерий.

MATERIALS AND METHODS

В ходе исследования проведено выделение чистых культур актинобактерий из пресноводной водоросли *D. baicalensis*. Образцы водоросли, отобранные в пос. Большие Коты (Южный Байкал), были помещены в стерильные микропробирки, где хранились в растворе стерильного 20% глицерина в морозильнике при температуре – 20 °С до высева на твердые питательные среды. Размороженные и гомогенизированные образцы водоросли интенсивно взбивали на мешалке при скорости 480–620 об/мин в течение 30 минут. Полученный водно-глицероловый экстракт был высеян газоном на стерильные твердые питательные среды (MS, агар Чапека, Actinomycete-isolation agar) с добавлением антибиотиков, подавляющих рост бактерий и грибов: циклогексимида и фосфомицина (Kieser *et al.*, 2000).

Идентификацию штаммов проводили посредством амплификации и секвенирования фрагмента гена 16S rPHK с праймерами: 8F (AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG), 1510R (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T), ACT235F (CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG) и ACT878R (CCG TAC TCC CCA GGC GGG G). Секвенирование проводили на базе ООО Синтол (г. Москва).

Для определения антибиотической активности выделенные штаммы культивировали в трех жидких питательных средах, в т.ч. NL-19, SM17, SG. Штаммы культивировали при температуре 28 °С в течение 7 дней на шейкере при интенсивности перемешивания 180 rpm. Культуральная жидкость и биомасса были разделены центрифугированием при 3 000 g в течение 10 мин. Вторичные метаболиты экстрагированы этилацетатом из культуральной жидкости. Для биомассы использовали смесь ацетона и метанола в соотношении 1:1. Полученные экстракты были сконцентрированы в токе азота при 40 °С, а сухой остаток растворен до концентрации 25 мг/л в метаноле (Sigma, St. Louis, USA) (Sarker *et al.*, 2005). Анализ антимикробной активности проводили спектрофотометрически на базе планшетного спектрофотометра Tecan M200 (Австрия) при длине волны 610 нм. В качестве

положительных контролей использовали антибиотики – цефтриаксон и стрептомицин. Эксперимент проведен трехкратно.

RESULTS AND DISCUSSION

В ходе данной работы выделено 9 культивируемых штаммов актинобактерий. BLAST – анализ последовательностей выявил высокую схожесть штаммов по гену 16S рРНК для изолятов актинобактерий, ассоциированных с водорослью *D. baikalensis*, с последовательностями штаммов актинобактерий, полученными из базы данных GenBank (NCBI) (не менее 97 %). В ходе проведенной работы идентифицированы все выделенные штаммы. Установлено, что 5 штаммов принадлежали представителям рода *Streptomyces*. Также, было выделено по одному представителю родов *Saccharopolyspora*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* и *Nonomurea*.

Макрофотографии штаммов, выделенных в ходе настоящего исследования, и схема разнообразия культивируемых актинобактерий представлены на рис. 1.

На рис. 2. приведено бескорневое филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основании сравнения результатов секвенирования полученных последовательностей гена 16S рРНК с последовательностями актинобактерий из GenBank, NCBI. В качестве внешней группы (аутгруппы) использовали бактерию вида *Bacillus licheniformis*, зачастую наблюдаемую в составе микробных сообществ ризосферы различных растений. Исходя из представленных материалов видно, что выделенные штаммы формируют отдельные клады с представителями схожих видов.

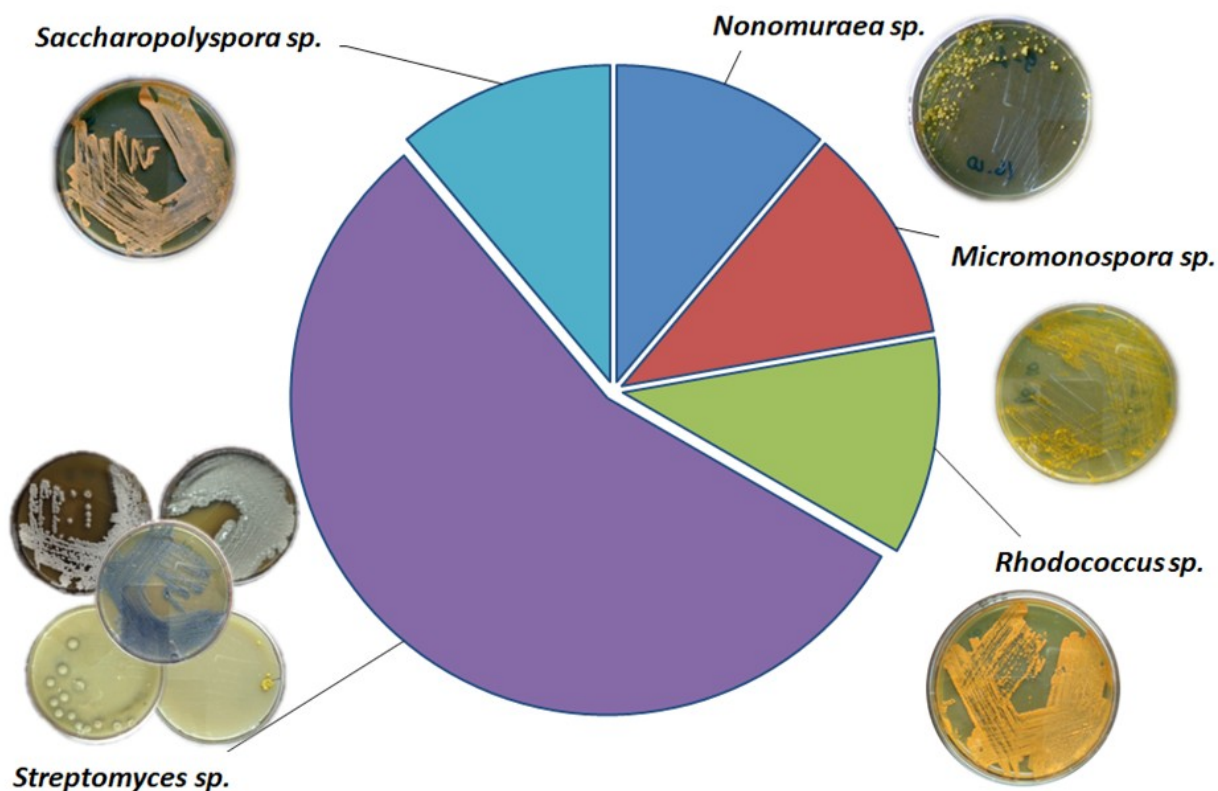


Figure 1. Распределение и макрофотографии штаммов актинобактерий, ассоциированных с водорослью *D. baikalensis*.

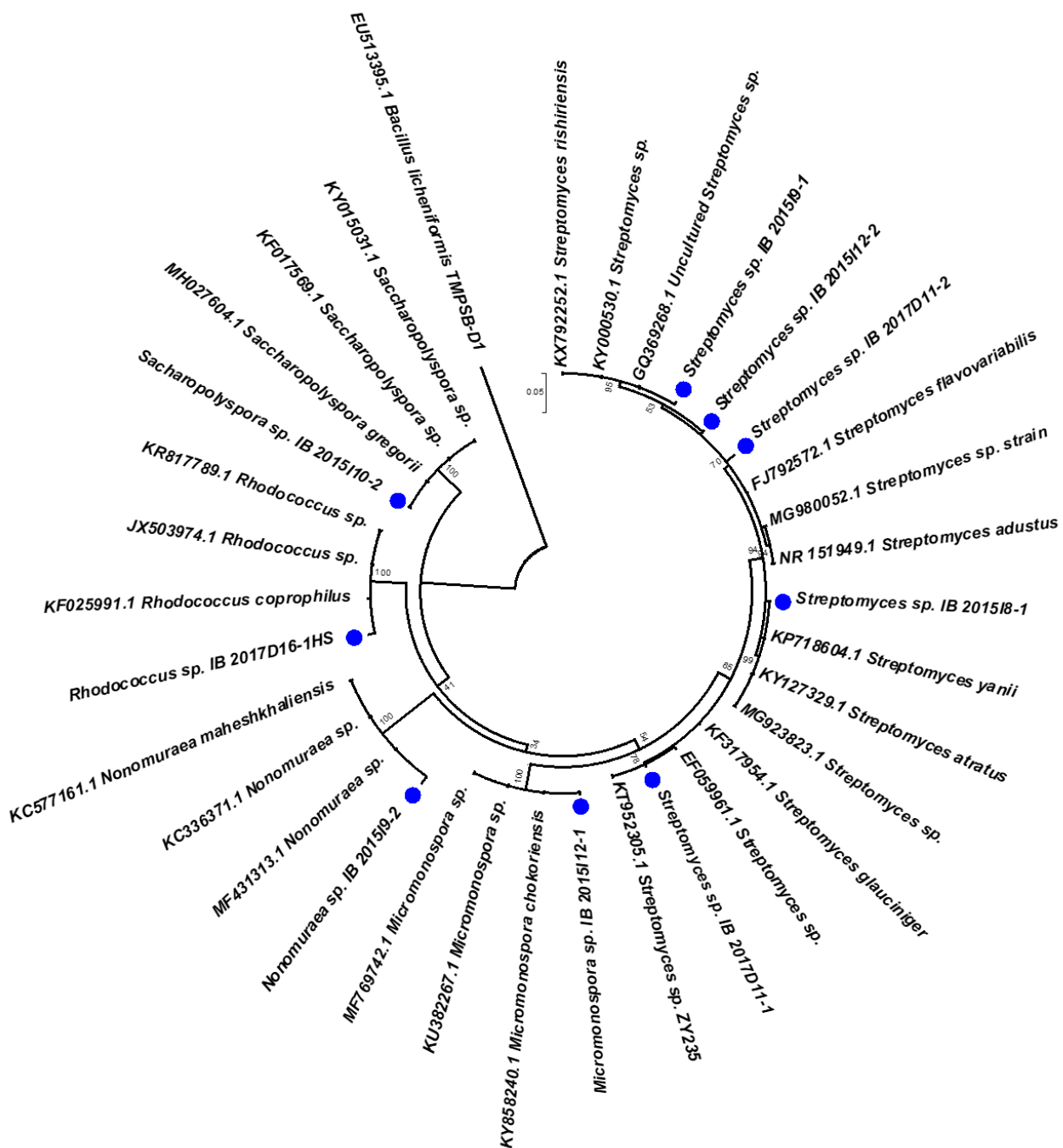


Figure 2. Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия на основании сравнения результатов секвенирования полученных последовательностей гена 16S рПНК с последовательностями актинобактерий, зарегистрированными в GenBank NCBI. Бутстреп - 1000. Анализ включал 34 последовательности длиной 432 нуклеотида, в т.ч. 9 бактерий, выделенных в ходе настоящего исследования. Анализ проведен в программе MEGA 7. Внешняя группа – *B. licheniformis*. Синий маркер – штаммы, выделенные в ходе настоящего исследования.

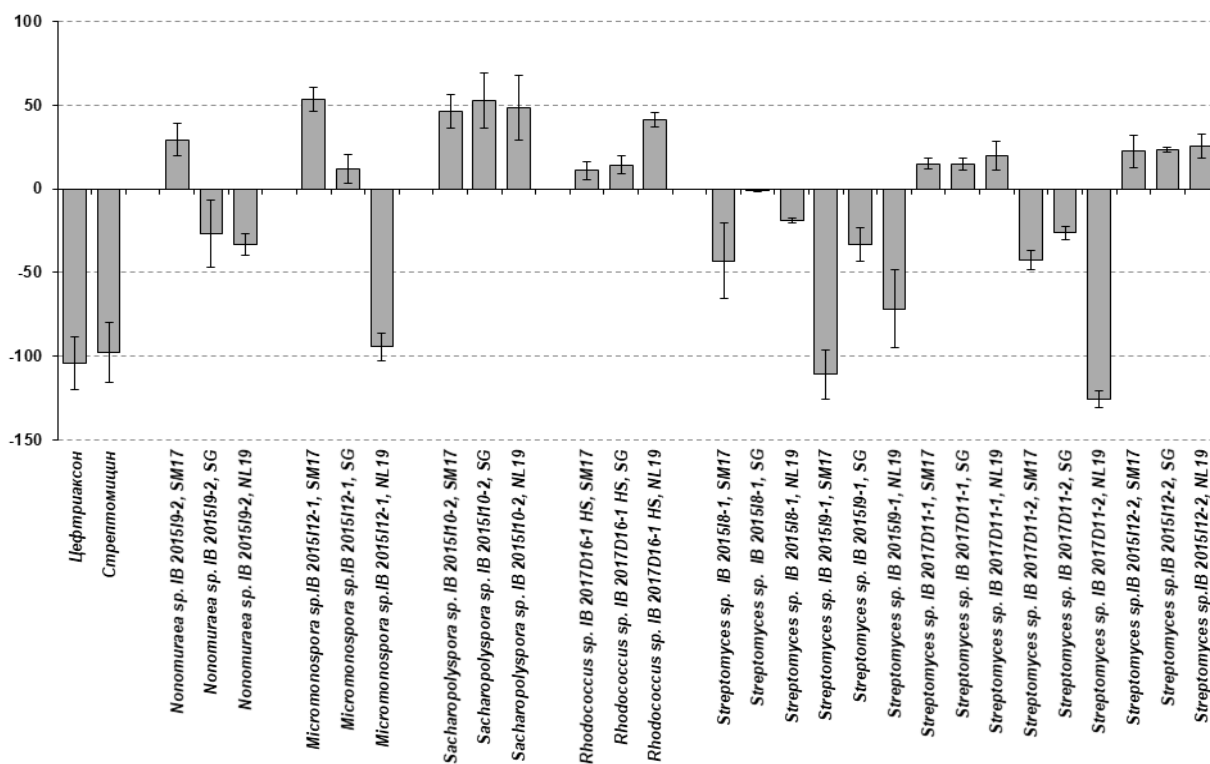


Figure 3. Антимикробная активность экстрактов культуральной жидкости выделенных штаммов при концентрации 25 мкг/л против *B. subtilis*. Ось абсцисс – наименование выделенных штаммов и питательных сред. Ось ординат – интенсивность роста (гибели) тест – культуры *B. subtilis*.

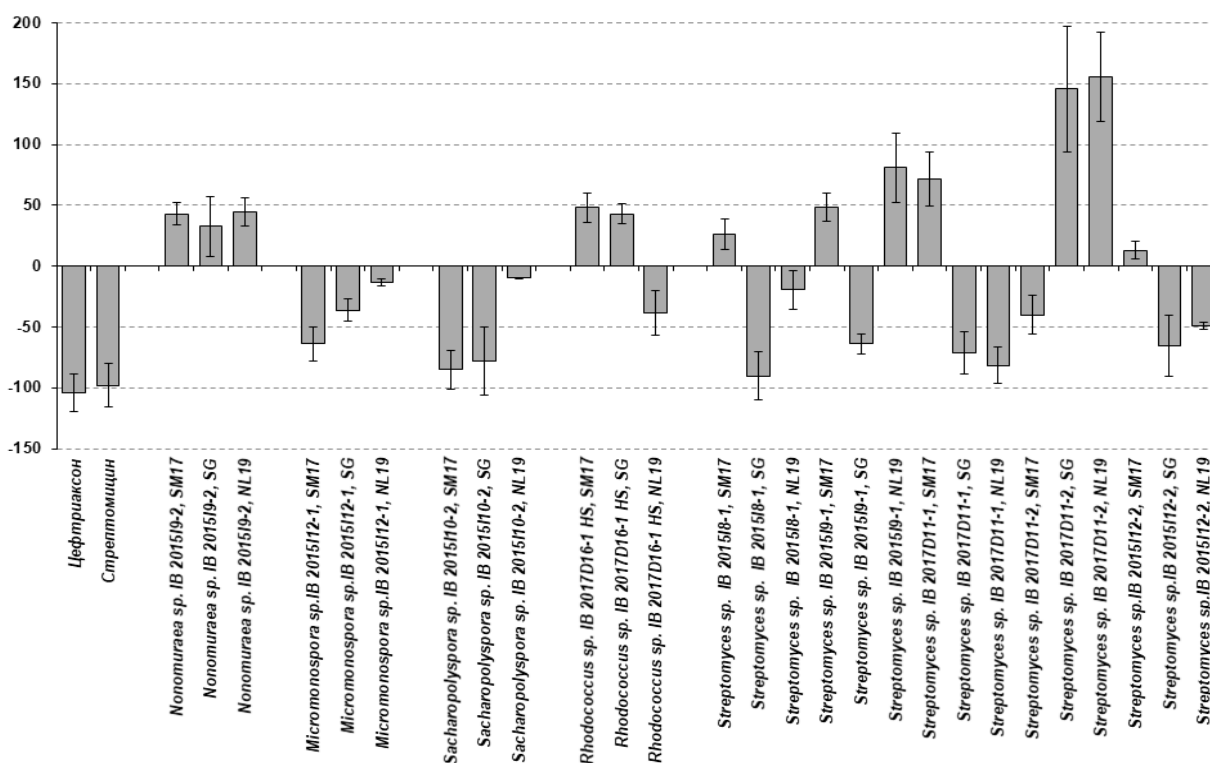


Figure 4. Антимикробная активность экстрактов клеточной биомассы выделенных штаммов при концентрации 25 мкг/л против *B. subtilis*. Ось абсцисс – наименование выделенных штаммов и питательных сред. Ось ординат – интенсивность роста (гибели) тест – культуры *B. subtilis*.

При оценке антимикробной активности установлено, что наиболее выраженной антимикробной активностью против роста *B. subtilis* при концентрации 25 мкг/л обладали экстракты культуральных жидкостей штаммов *Micromonospora* sp. IB 2015I12-1, *Streptomyces* sp. IB 2015I9-1 и *Streptomyces* sp. IB 2017D11-2 (Рис.3). Однако экстракты, полученные из биомассы этих штаммов активности против *B. subtilis* не проявляли. Среди экстрактов, полученных из биомассы, активностью обладали штаммы *Saccharopolyspora* sp. IB 2015I10-2, *Streptomyces* sp. IB 2017D8-1 и *Streptomyces* sp. IB 2017D11-1 (Рис. 4).

Таким образом, в ходе исследования из образцов водоросли *D. baicalensis* выделены как широко распространенные штаммы рода *Streptomyces*, так и менее распространенные представители родов *Saccharopolyspora*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus* и *Micromonospora*.

Стоит отметить, что согласно полученным материалам, разнообразие культивируемых штаммов актинобактерий, выделенных из образцов *D. baicalensis*, сопоставимо с разнообразием культивируемых актинобактерий, выделенных ранее из пыльцы сосны обыкновенной (Ахенов-Gribanov *et al.*, 2016), произрастающей на берегу озера Байкал. В то же время, разнообразие культивируемых актинобактерий выделенных из водоросли значительно превышает актинобактериальное разнообразие культивируемых штаммов, описанное для макробеспозвоночных, байкальской воды и осадков озера Байкал (Terkina *et al.*, 2006; Ахенов-Gribanov *et al.*, 2016; Protasov *et al.* 2017). Подобно и иным исследованиям, проводимым в Байкальском и других регионах, род *Streptomyces* является наиболее распространенным и доминантным. При этом, в ходе настоящего исследования впервые для экосистемы озера Байкал были выделены представители родов *Nonomuraea* sp. и *Saccharopolyspora* sp. Необходимо отметить, что в ходе настоящей работы представители рода *Nonomuraea* sp. впервые были выделены из водорослей, а для рода *Saccharopolyspora* sp. в системе NCBI зарегистрирована лишь одна нуклеотидная последовательность для

представителей данного рода, которая получена при оценке микробных сообществ водоросли *Nostoc* sp. Таким образом, настоящее исследование служит первым упоминанием обитания актинобактерий рода *Nonomuraea* sp. и *Saccharopolyspora* sp. в экосистеме озера Байкал.

Обращаясь к оценке роли бактериальных сообществ в жизнедеятельности водорослей, в исследовании Michel *et al.* (2010) показано, что некоторые водоросли и актинобактерии тесно связаны в своей эволюции. К примеру, известно что водорослю *Ectocarpus siliculosus* унаследованы от актинобактерий терминальные стадии биосинтеза целлюлозы и гемицеллюлозы (путем горизонтального переноса генов). Вместе с тем, другим примером роли данных микроорганизмов в жизнедеятельности водорослей служит перенос генов поликетидсинтаз актинобактерий в организм аскомицетов, входящих в сообщества лишайников (Hock, 2012).

Микроорганизмы нетривиальных экосистем и экстремофильных сообществ зачастую выступают источниками новых антибиотиков и природных соединений. Среди работ с водорослями таким известным примером выступает актинобактерия *Nocardia* sp. ALAA 2000, выделенная из водоросли *Laurenica spectabilis*. Исследованиями El-Gendy *et al.*, (2008) показано, что данная бактерия синтезирует 4 антибиотика, в т.ч. chrysophanol 8-methyl ether, asphodelin, justicidin B и ayamycin. Данные антибиотики обладают выраженной антимикробной активностью как против грамположительных и грамотрицательных бактерий, так и против грибов при минимальной ингибирующей концентрации 0,110 мкг/мл.

Таким образом, штаммы, способные подавлять рост и развитие иных микроорганизмов имеют важное биотехнологическое значение. Принимая во внимание большое число редких и активных штаммов, ассоциированных с эндемичной водорослью *D. baicalensis*, нами показано, что данные микроорганизмы обладают ценностью для биомедицинских и биотехнологических разработок и открытия новых природных соединений, в том числе

и антибиотиков.

ACKNOWLEDGEMENT

Настоящее исследование проведено при частичной финансовой поддержке проектов РНФ (17-14-01063), РФФИ (16-34-60060, 18-34-00294), проектов Минобрнауки РФ 6.9654.2017/8.9, 6.12738.2018/12.2, а также Фонда поддержки прикладных экологических разработок и исследований «Озеро Байкал»

REFERENCES

- Acevedo, E. (1993) Potential of carbon isotope Axenov-Gribanov D. V., Voytsekhovskaya I. V., Rebets Y. V., Tokovenko B. T., Penzina T. A., Gornostay T. G., & Timofeyev M. A. (2016). Actinobacteria possessing antimicrobial and antioxidant activities isolated from the pollen of scots pine (*Pinus sylvestris*) grown on the Baikal shore. *Anton Leeuw Int J G*, **109(10)**, 1307-1322.
- El-Gendy M. M., Hawas U. W., & Jaspars M. (2008). Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000. *J Antibiot*, **61(6)**, 379.
- Hock B. (Ed.). (2012). Fungal associations (Vol. 9). Springer Science & Business Media.
- Jenke-Kodama H., & Dittmann E. (2009). Evolution of metabolic diversity: insights from microbial polyketide synthases. *Phytochemistry*, **70(15-16)**, 1858-1866.
- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., & Hopwood D. A. (2000). Growth and preservation of *Streptomyces*. *Practical Streptomyces Genetics*, 43-61.
- Michel G., Tonon T., Scornet D., Cock J. M., & Kloareg B. (2010). The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytol*, **188(1)**, 82-97.
- Protasov E.S., Axenov-Gribanov D.V., Rebets Y.V., Voytsekhovskaya I.V., Tokovenko B.T., Shatilina Z.M., & Timofeyev M.A. (2017). The diversity and antibiotic properties of actinobacteria associated with endemic deepwater amphipods of Lake Baikal. *Anton Leeuw Int J G*, **110(12)**, 1593-1611.
- Sarker S. D., Latif Z., & Gray A. I. (Eds.). (2005). Natural products isolation (Vol. 20). Springer Science & Business Media.
- Terkina I. A., Drukker V. V., Parfenova V. V., & Kostornova T. Y. (2002). The biodiversity of actinomycetes in Lake Baikal. *Microbiology*, **71(3)**, 346-349.
- Timoshkin O.A., Sitnikova T.Y., Rusinek O.T., Pronin N.M., Proviz V.I., Mel'nik N.G., Kamaltynov R.M., Mazepova G.F., Adov F.V., Anohin B.A., Arov I.V., Baldanova D.R., Biserov V.I., Bondarenko N.A., Burdukovskaja T.G., Grajger M.Dzh., Danilov S.N., Dzubaba E.V., Dubeshko L.N., Dugarov Zh.N., Dudichev A.L., Evstigneeva T.D., Efremova S.M., Zhil'cova L.A., Kavakatsu M., Korgina E.M., Korobkova N.V., Krickaja U.A., Kutikova L.A., Ljamkin V.F., Natjaganova A.V., Naumova T.V., Nekrasov A.V., Novikova O.A., Obolkina L.A., Okuneva G.L., Podtjzhkina M.M., Pomazkova G.I., Popov V.V., Pronina S.V., Rozhkova N.A., Sanzhieva S.D., Semernoj V.P., Sideleva V.G., Slugina Z.V., Starobogatov Ja., Stepan'janc S.D., Tanichev A.I., Tuzovskij P.V., Hamnueva T.R., Calolihin S.Ja, Sheveleva N.G., Shibanova I.V., Shirokaja A.A., Shoshinin A.V. (2001) Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area, Nowosibirsk: Nauka.
- Tiwari K., & Gupta R. K. (2012). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Crit Rev Biotechnol*, **32(2)**, 108-132.