

**Б.П. Мацелюх, О.І. Бамбура, О.П. Копейко, О.В. Стоянова**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, ДЗО3680, Україна*

## **ВИДІЛЕННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБІОТИКІВ СТРЕПТОМІЦЕТІВ, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ ҐРУНТІВ УКРАЇНИ**

*Виділено і очищено за допомогою тонкошарової хроматографії 13 антибіотиків червоного, рожевого, жовтого і фіолетового кольорів, які синтезуються ґрунтовими стрептоміцетами на повноцінному кукурудзяно-соевому середовищі. Визначено антибіотичну активність одержаних сполук відносно ряду грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, а також дріжджів. Встановлено максимуми поглинання антибіотиків у видимому і УФ-світлі. Одержано попередні дані про наявність у структурі молекул більшості антибіотиків вуглеводного компонента, а також про індикаторні властивості антибіотиків червоного кольору. Зроблено припущення про можливу спорідненість деяких антибіотиків з антрациклінами і ансаміцинами.*

*К л ю ч о в і с л о в а: ґрунтові стрептоміцети, кольорові антибіотики, антимікробний спектр, спектри поглинання.*

Виділення, дослідження структури та функції і впровадження в медичну практику нових антибіотиків залишається важливою і актуальною медико-біологічною проблемою, не зважаючи на поширену в пресі думку про кінець ери цих біологічно активних сполук у зв'язку із зростанням частоти виділення патогенних мікроорганізмів і ракових клітин, стійких до відомих антибіотичних препаратів, а також відмовою деяких фармацевтичних компаній від реалізації дослідницьких програм із пошуку природних антимікробних сполук для лікування інфекційних хвороб. Ідентифікація нових антибіотиків останнім часом знизилася, не дивлячись на досягнення таких ефективних експериментальних підходів, як геноміка і комбінаторний хімічний синтез та високу вирішальну здатність дослідів *in vitro*.

Більшість антибіотиків, які сьогодні застосовуються в клініці, синтезуються ґрунтовими стрептоміцетами і грибами. Ці лікувальні сполуки, як правило, були відкриті за допомогою використання цілих клітин патогенних мікроорганізмів у ролі тест-систем. Сьогодні дослідники використовують спеціальні мішені *in vitro*, які дозволяють виявити дію антибіотиків на окремі біохімічні процеси або ферменти. Все-таки цілісні клітини в ролі тест-організмів мають перевагу над гіпотетичними молекулярними мішенями в пошуку ефективних лікарських препаратів, які мають більш комплексну і виражену дію на патогени.

Шляхи біосинтезу антибіотиків у стрептоміцетів дуже різноманітні. Є такі, що спільні багатьом видам стрептоміцетів, а є і дуже рідкісні. Тому одні антибіотичні сполуки можна знайти частіше серед стрептоміцетів, а інші – дуже рідко. Наприклад, стрептотріцин продукують біля 10 % наздогад виділених ґрунтових стрептоміцетів, стрептоміцин – 1 %, актиноміцин – 0,1 %, еритроміцин і ванкоміцин –  $5 \times 10^{-6}$  і  $1,5 \times 10^{-5}$  відповідно [3]. Багато антибіотиків (біля 2000) виділено із частотою  $1-2 \cdot 10^{-7}$  на ізольований навання стрептоміцет. Із наявних у ґрунтах  $10^{26}$  стрептоміцетів досліджено дуже мізерну частину –  $10^7$ .

Метою даної роботи було виділення стрептоміцетів із зразків ґрунту різних місцевостей України, які синтезують антибіотики з протипухлинною активністю. Оскільки відомі протипухлинні антибіотики в більшості випадків мають червоний, помаранчевий або жовтий колір і пригнічують ріст в основному грампозитивних мікроорганізмів, ми сконцентрували увагу на виділенні саме таких пігментів, використовуючи в ролі тест-культури штам *Streptomyces levoris* 165, чутливий до багатьох антрациклінових і полікетидних антибіотиків.

**Матеріали і методи.** Зразки поверхневого ґрунту на глибині до 2-х см забирали в стерильні пробірки в околицях Києва, Решетилівки, Ржищева, Кам'яної могили (Мелітополь) і Трипілля. Суспензію ґрунту в стерильній дистильованій воді висівали на повноцінне кукурудзяно-соеве середовище (КС) в чашках Петрі (г/л: мука кукурудзяна – 20,0, мука соєва – 10,0, NaCl – 5,0, агар – 10,0, дистильована вода – 1 л, стерилізація при 121°C протягом 30 хвилин), в яке вносили триметопрім і ністатин з метою пригнічення росту бактерій і грибів. Чашки інкубували в термостаті при 28 °C протягом тижня і окремі колонії стрептоміцетів пересівали

на скошений КС-агар для збереження і наступного дослідження. На цьому етапі відбирали колонії стрептоміцетів, пігменти яких забарвлювали субстратний міцелій або середовище в жовтий, червоно-рожевий або фіолетовий кольори. Попередню антибіотичну активність виділених стрептоміцетів визначали за допомогою методу агарових дисків із газонів 5-добових культур, покладених на поверхню бакагару, що містив спори тест-культури *S. levoris* 165. Після попереднього відбору найбільш активних штамів досліджували антибіотичну активність екстрактів агаризованих культур. Газони 5-добових культур (5 чашок) нарізали кубиками 1x1 см і антибіотичні сполуки екстрагували сумішню хлороформу-ацетону (2:1), висушували в ротормному вакуумному випарникові і розчиняли в 1,0 мл етанолу. Антибіотичну активність одержаних сирців перевіряли за допомогою методу лунок, які вирізали в центрі агаризованого середовища S в чашках Петрі, засіяного тест-культурами (г/л: пептон – 4,0, дріжджовий екстракт – 4,0,  $K_2HPO_4$  – 0,5,  $MgSO_4$  – 0,25, агар – 15,0, дистильована вода – 1 л, стерилізація при 121 °C протягом 30 хвилин). В кожен лунку вносили 20 мкл сирцю в етанолі. Кількість окремих компонентів кожного сирцю антибіотиків визначали за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ) з використанням алюмінієвих пластинок 20x20 см фірми Merck (Silica gel 60 F<sub>254</sub>) і 10x15 см виробництва Краснодар (Sorbfil, ПТСХ-АФ-В-УФ) і різних систем органічних розчинників [1]. Найкраще розганяла і розділяла окремі компоненти суміші антибіотиків система розчинників етилацетат-ацетон-етанол-оцтова кислота (2 : 1 : 1 : 0,6). Окремі чіткі плями кольорових антибіотиків, добре помітні у видимому і УФ-світлі, знімали разом із силікагелем із пластинок, розчиняли в етанолі або поміщали на поверхню бакагару, що містив окремі тест-культури грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, а також грибів. Етанольні розчини очищених антибіотиків використовували для одержання спектрів поглинання за допомогою спектрофотометра Beckman DU 8.

**Результати та їх обговорення.** Із зразків ґрунту різних місцевостей України виділено більше 300 ізолятів стрептоміцетів, які утворювали жовтий, рожевий і червоний антибіотики при вирощуванні на агаризованому кукурудзяно-соєвому середовищі. Після первинної перевірки антибіотичної активності за допомогою блоків із 5-денних газонів відносно тест-культури *S. levoris* 165 відібрано 60 найбільш активних штамів стрептоміцетів для дальшого дослідження їх метаболітів, екстрагованих хлороформом і ацетоном (2:1).

У табл. 1 наведені назви і походження штамів, колір антибіотиків, їх антимікробний спектр і максимуми поглинання у видимому і УФ-світлі. На цьому другому етапі роботи із 60-ти первинно відібраних штамів стрептоміцетів більш детально досліджувалось 13. Більшість із них утворювали антибіотики червоного (4 штами) і жовтого (6 штамів) кольорів, два штами – рожевого, і лише один штам – фіолетового кольору. За антимікробним спектром антибіотики віднесені до 3-х груп. Перша група пригнічує ріст тільки грампозитивних мікроорганізмів (8 сполук); друга – грампозитивних мікроорганізмів і дріжджів (3 сполуки) і третя – грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, а також дріжджів (2 метаболіти) (табл. 2).

Для дослідження показників хроматографічної рухливості (Rf) і спектрів поглинання антибіотиків у видимому й УФ-світлі використовували препарати, очищені за допомогою ТШХ. Чіткі плями окремих компонентів антибіотиків на алюмінієвих силікагелевих пластинках фіксували у видимому й УФ-світлі, знімали із пластинок разом із носієм, розчиняли в етанолі і сорбент осаджували центрифугуванням при 11 тис. об/хв. Антибіотичну активність індивідуальних компонентів, одержаних за допомогою ТШХ, перевіряли приведеними вище методами. На рис. 2 наведені зони пригнічення росту тест-культур, спричинені очищеними антибіотиками. Максимуми поглинання сполук, які виявили найвищу антибіотичну активність, подано в табл. 1 і на рис. 1-4.

На основі антимікробних спектрів і максимумів поглинання 13 досліджуваних антибіотиків можна умовно віднести до 5 груп біологічно активних сполук. Найбільшу групу становлять антибіотики червоного кольору, які синтезують штами Tr1, Tr15, Tr45 і РЖ7. Вони пригнічують ріст тільки грампозитивних (Tr1, Tr45 і РЖ7) або грампозитивних мікроорганізмів і дріжджів (Tr15). Максимуми поглинання цих сполук подібні до таких антрациклінових антибіотиків рубо-, доксо- і карміноміцинів, грізеорубіну і родоміцину (233-238, 252-255, 290-295, 469, 477-480, 487-489, 493-495, 521, 530-535 нм [1, 2]). Як відомо з даних літератури, ці антибіотики мають протипухлинну активність і використовуються в онкологічній клініці. Другу групу антибіотиків становлять сполуки жовтого кольору, які синтезуються

штамами Тр151, 13К і 14К і пригнічують ріст грам позитивних мікроорганізмів (Тр151) і дріжджів (13К, 14К). За максимумами поглинання ці антибіотики можна віднести до родини ансаміцинів, які мають у своїй структурі нафталінове, нафтохінонове або бензохінонове кільця (гельданаміцини, гранатіцин, гранатоміцини, ріфампіцини, рубрадірин, стрептоваріцини та ін.). Названі ансаміцини мають максимуми поглинання 215, 232-237, 250-255, 334-335, 495, 525 нм [4-6]. Окремі жовті (продуценти КМ2, РЖ2 і Тр7), фіолетовий (Тр82) і рожевий (РШ1ч) антибіотики характеризуються малим числом піків поглинання і поки що не віднесені до відомих груп антибіотичних сполук.

Слід зазначити, що антибіотики штамів КМ2 і Тр7 мають найбільш широкий спектр антибіотичної активності, пригнічуючи ріст грам позитивних і грам негативних мікроорганізмів і дріжджів.

Більшість із досліджених антибіотиків позитивно реагує з фенолом і сірчаною кислотою (забарвлює розчин), що вказує на присутність вуглеводного компоненту в структурі їх молекул. Червоні антибіотики мають індикаторні властивості, міняючи свій колір у лужному і кислому середовищах.

Наступним етапом нашої роботи передбачається дослідження протипухлинної активності виділених антибіотиків та дослідження їх молекулярної ваги і структури за допомогою ВЕРХ і ЯМР.

**Таблиця 1**

**Властивості антибіотиків стрептоміцетів**

Штам	Проба землі (місцевість)	Колір сполуки	Антимікробний спектр	Максимуми поглинання, нм
Тр1	Трипілля	Червоний	Грам позитивні мікроорганізми	232, 253, 353, 485, 495
Тр45	«	«	«	232, 255, 286, 485, 491, 511, 525
Рж7	Ржищів	«	«	485, 495, 529, 590
Тр15	Трипілля	«	Грам позитивні м.о., дріжджі	232, 255, 286, 485, 491, 511
Тр151	«	Жовтий	Грам позитивні мікроорганізми	227, 252, 485, 512
13К	Київ	«	Грам позитивні м.о., дріжджі	227, 255, 285, 380, 430, 488, 511, 525
14К	«	«	«	227, 255, 287, 434, 449, 490, 511, 525
КМ2	Кам'яна могила	«	Грам позитивні і грам негативні м.о., дріжджі	485, 512
Рж2	Ржищів	«	Грам позитивні мікроорганізми	220, 430
Тр7	Трипілля	«	Грам позитивні і грам негативні м.о., дріжджі	262
Рш1	Решетилівка	Рожевий	Грам позитивні мікроорганізми	212, 257-260
К29	Київ	«	«	258
Тр82	Трипілля	Фіолетовий	«	238, 485

## Антибіотична активність екстрактів культур стрептоміцетів

Діаметр зони відсутності росту (мм) навколо лунки з антибіотиками штамів

Тест- культура	Тр1	Тр45	Тр82	Тр151	Рж2	Рж7	Рш1	К29	Тр15	13К	14К	Тр7	КМ2
<i>Bacillus subtilis</i> B-901	20	14	18	19	20	22	28	25	26	18	16	19	26
<i>Staphylococcus aureus</i> B-904	22	12	24	17	20	27	18	21	29	19	14	28	26
<i>Micrococcus varians</i> Ac-613	22	14	20	17	14	28	26	35	27	28	18	20	22
<i>Mycobacterium phlei</i> Ac-402	24	11	24	17	26	28	30	28	26	24	16	29	27
<i>Nocardia asteroides</i> Ac-405	26	34	34	18	16	18	28	17	22	18	38	30	20
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	20	10	15	20	16	20	30	16	21	22	20	21	17
<i>Gordonia bronchiales</i> Ac-737	26	20	24	25	26	25	20	28	28	34	25	30	34
<i>Streptomyces levoris</i> 165	22	22	30	28	24	30	32	26	34	25	22	26	28
<i>Escherichia coli</i> B-906	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	24
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	25
<i>Pectobacterium carotovorum</i> 8982	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	14	14
<i>Candida albicans</i> J-1918	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	14	10

\* Відсутність росту за межами лунки діаметром 8 мм

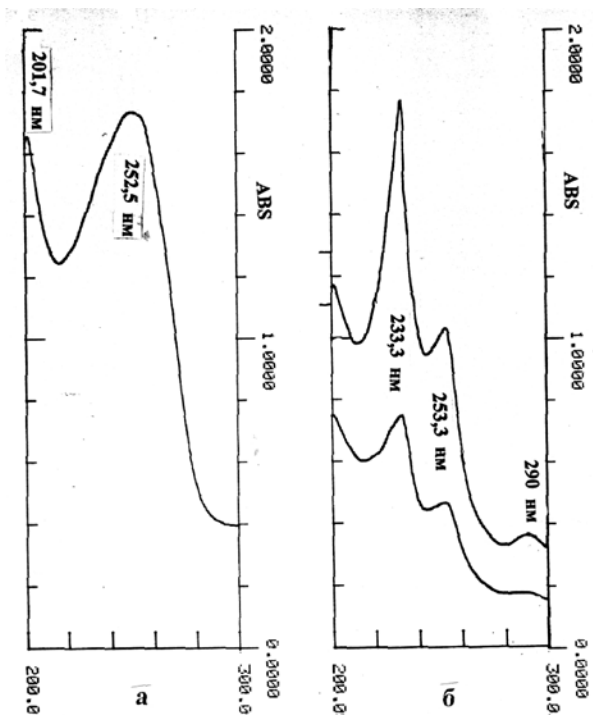


Рис. 1. Спектри поглинання антибіотиків штамів Тр151 (а), Тр1 (б, нижня крива) і Тр15 (б, верхня крива).

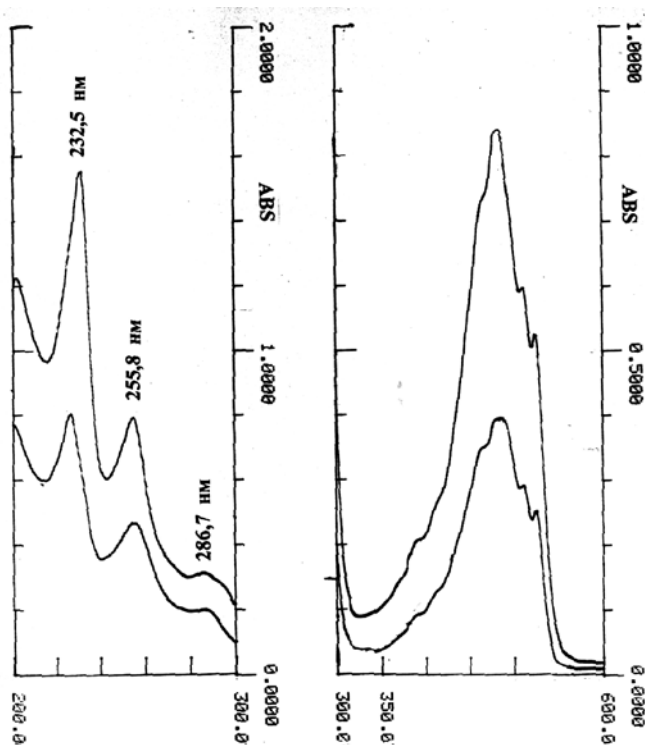


Рис. 2. Спектри поглинання антибіотиків штамів 14К (нижня крива) і Тр45 (верхня крива).

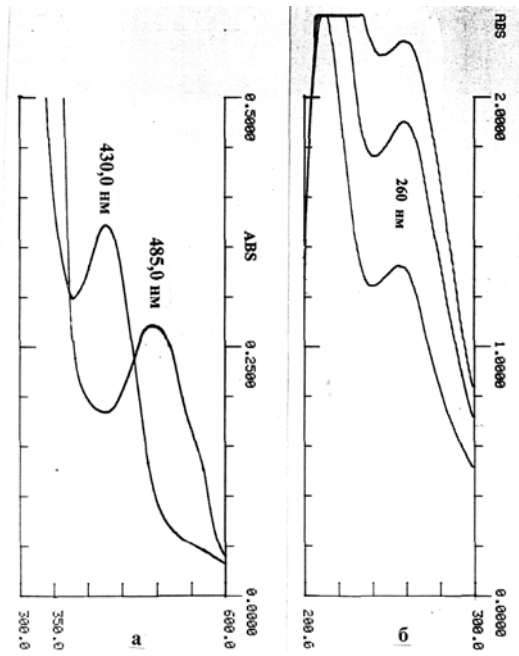


Рис. 3. Спектри поглинання антибіотиків штамів Тр82 (а, нижня крива), Рж2 (а, верхня крива) і РШ1 (б).

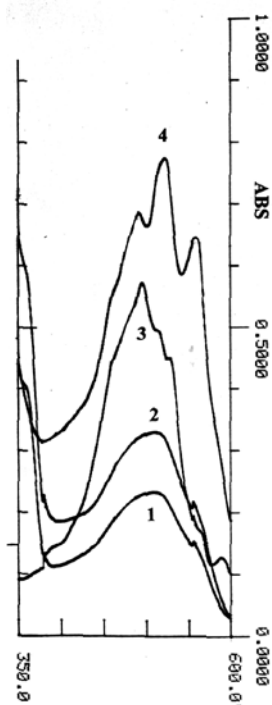


Рис. 4. Спектри поглинання антибіотиків штамів Тр151 (1), КМ2 (2), Рж7 (3, 4).

**Б.П. Мацелюх, О.И. Бамбура, О.П. Копейко, О.Л. Стоянова**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев*

## **ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБИОТИКОВ СТРЕПТОМИЦЕТОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ПОЧВ УКРАИНЫ**

### **Резюме**

Выделено и очищено с помощью тонкослойной хроматографии 13 антибиотиков красного, розового, желтого и фиолетового цвета, которые синтезируются почвенными стрептомицетами на полноценной кукурузно-соевой среде. Определено антибиотическую активность полученных соединений по отношению к ряду грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а также дрожжей. Установлено максимумы поглощения антибиотиков в видимом и УФ-свете. Получены предварительные данные о наличии в структуре молекул большинства антибиотиков углеводного компонента, а также об индикаторных свойствах антибиотиков красного цвета. Сделано предположение о возможном родстве некоторых антибиотиков с антрациклинами и ансамидинами.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** почвенные стрептомицеты, цветные антибиотики, антимикробный спектр, спектры поглощения.

***B.P. Matselyukh, O.I. Bambura, O.P. Kopeyko, O.L. Stoyanova***

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **EXTRACTION AND PROPERTIES OF STREPTOMYCETE ANTIBIOTICS ISOLATED FROM SOILS OF UKRAINE**

### **S u m m a r y**

Thirteen antibiotics of red, rose, yellow and violet color, which are synthesized by the soil Streptomyces on the complete corn-bean medium have been isolated and purified by means of thin layer chromatography. Antibiotic activity of the obtained compounds has been determined against a series of gram-positive and gram-negative microorganisms, and also yeasts. The maxima of absorption of antibiotics in visible and UV-light were established. The preliminary results are obtained about the presence of sugar component in the structure of molecules, as well as the indicator properties of the red-color antibiotics. The assumption was proposed about the affinity of some antibiotics for anthracyclines and ansamycines.

The paper is presented in Ukrainian.

**К е y w o r d s:** soil Streptomyces, color antibiotics, antimicrobial spectrum, spectra of absorption.

**T h e a u t h o r ' s a d d r e s s:** *Matselyukh B.P.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Antibiotics*, isolation, separation, and purification/ Ed. by M.J. Weinstein, G.H. Wagman. – Elsevier Scientific Publishing Co., 1978. – 771 p.
2. *Anthracycline Chemistry and Biology 1*: K. Krohn. Biological Occurrence and Biosynthesis, Synthesis and Chemistry. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2008. – 324 p.
3. *Baltz R.H.* Antimicrobials from Actinomycetes: back to the future// *Microbe*. – 2007. – 2, N 3. – P. 125–131.
4. *Dictionary of Antibiotics and Related Substances*/ B.W. Bycroft, A.A. Higton, A.D. Roberts. – Chapman and Hall, 1988 – 944 p.
5. *Lombo F., Menendez N., Salas J.A., Mendez C.* The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action and novel derivatives / *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – 73. – P. 1–14.
6. *Wehrli W.* Ansamycine chemistry, biosynthesis and biological activity/ *Topics in Current Chemistry*. – 1977. – 72. – P. 21–49.

Отримано 14.03.2010