

МРНТИ: 34.27.19

Г.Б. БАЙМАХАНОВА¹, Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹, Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹,
Г.А. МОМБЕКОВА¹, Б.Б. БАЙМАХАНОВА¹, А.С. БАЛГИМБАЕВА^{1*},
Д.А. ТЛЕУБЕКОВА¹, М.А. АҚЫЛОВА², А.Х. СЕРИКОВА², Ш.Ж. ДАУРЕНБЕКОВА³,
Т.Д. ДООЛОТКЕЛЬДИЕВА⁴, Л.П. ТРЕНОЖНИКОВА¹

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Центральная клиническая больница, Алматы, Казахстан

³Жетысуский университет им. И. Жансугурова, Талдыкорган, Казахстан

⁴Кыргызко-Турецкий Университет Манас, Бишкек, Кыргызстан

*e-mail: imv_rk@list.ru

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ АКТИНОМИЦЕТОВ ИЗ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ КАЗАХСТАНА

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.12

Аннотация

Повсеместно применяемая антибиотикотерапия имеет ряд негативных последствий, одно из которых проявляется в формировании множественной резистентности микроорганизмов к еще недавно успешно применяемым лекарственным средствам. Отсутствие новых классов антибиотиков в сочетании с повышенной устойчивостью к ним возбудителей инфекций требует незамедлительного скрининга новых природных соединений, имеющих новые мишени и механизмы действия и способных заменить лекарственные препараты, теряющие свою эффективность. Актинобактерии представляют собой многочисленный источник новых и жизненно важных биоактивных метаболитов для фармацевтического применения. В статье приводятся результаты исследования антибактериальных свойств изолятов актиномицетов, выделенных из засоленных почв и соленых озер Казахстана. 111 (16,6 %) изолятов экстремофильных актиномицетов проявили антибактериальные свойства против изученных грамположительных (*S. aureus*, MRSA) и 14 (2,1%) изолятов - против грамотрицательных (*E. coli*) тест-микроорганизмов. 12 изолятов (10,6%) экстремофильных актиномицетов с антибактериальными свойствами обладали широким спектром действия и были активны одновременно к грамположительным (*S. aureus*) и к грамотрицательным (*E. coli*) условно-патогенным возбудителям инфекций. Изоляты экстремофильных актиномицетов с антибактериальными свойствами в экстремальных условиях роста отобраны для дальнейших исследований, как перспективные продуценты новых природных соединений для медицины.

Ключевые слова: актиномицеты, антибиотики, антибактериальные свойства, спектр действия, условно-патогенные бактерии.

Устойчивость микроорганизмов является причиной интенсификации поиска новых антибактериальных агентов, как эффективного пути преодоления этого явления [1-3]. Актинобактерии представляют собой многочисленный источник новых и жизненно важных биоактивных метаболитов для фармацевтического применения [4]. Существует постоянный интерес к поиску новых природных биологически активных продуктов, необходимых для развития инновационной биотехнологии и фармакологии [5-8].

В последнее время выдвигается предпосылка, что разнообразие актиномицетов в малоизученных необычных средах существования может увеличить перспективы открытия новых соединений с потенциальной активностью, которые могут преодолеть множественную лекарственную устойчивость и быть перспективными для лечения хронических заболеваний, рака, вирусных инфекций [9-13]. Поэтому, экстремальные среды обитания микроорганизмов в настоящее время считаются наиболее интересными для биотехнологических исследований и рассматриваются как богатый источник новых специализированных метаболитов. Однако, исследования по скринингу природных антибиотиков из экстремальных сред обитания показали, что из этих источников

выделяются в большом количестве актиномицеты с нейтрофильными свойствами, которые могут являться хорошо изученными продуцентами известных природных антибиотиков. Многие актиномицеты обладают наборами кластеров биосинтетических генов BGC, кодирующих пути производства ценных вторичных метаболитов, которые могут включаться в работу только при определенных условиях. Недавние геномные подходы показали, что один штамм *Streptomyces* может иметь в среднем от 30 до 50 кластеров BGC, которые могут составлять 8–10% его генома [14, 15]. Это демонстрирует, насколько сложным является современный скрининг новых природных антибиотиков и как часто он может быть нерезультативным, даже при использовании необычных экстремальных источников.

Разработанная нами новая скрининговая программа, основанная на классификации актиномицетов в естественных условиях роста, позволяет исследователям сконцентрировать свои усилия на изучении штаммов, которые принадлежат к определенным группам [16]. Кроме того, она дает возможность создать условия для целенаправленной экспрессии «молчащих» генов биосинтеза новых фармацевтически ценных веществ с использованием определенных природных факторов.

Целью данной работы было исследование антибактериальных свойств актиномицетов, выделенных из необычных экосистем Казахстана в экстремальных условиях роста (соленость и pH) в соответствии с разработанной нами новой скрининговой программой.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись 667 изолятов экстремофильных актиномицетов, выделенных из экстремальных экосистем Северного, Западного и Южного Казахстана (солончаков, солонцов, ризосферы солеустойчивых растений, соленых озер).

Для определения антибактериальной активности изоляты экстремофильных актиномицетов культивировали на 3-х вариантах модифицированного агара Беннета (№1, 2, 3) при температуре 28-29°C в течение 10 суток в термостате Binder.

Состав вариантов модифицированного агара Беннета, (%):

Среда № 1: глюкоза - 0,2; дрожжевой экстракт - 0,1; пептон - 0,2; агар - 2,0; pH 7,2;

Среда № 2: глюкоза - 0,2; дрожжевой экстракт - 0,1; пептон - 0,2; NaCl - 3,5; агар - 2,0; pH 7,2;

Среда № 3: глюкоза - 0,2; дрожжевой экстракт - 0,1; пептон - 0,2; NaHCO₃ - 0,35; агар - 2,0; pH 9,0.

Для изучения антибактериальных свойств изолятов в качестве тест-микроорганизмов в исследование были взяты клинические штаммы грамположительных (*Staphylococcus aureus* № 228) и грамотрицательных (*Escherichia coli* № 603) условно-патогенных возбудителей инфекций с лекарственной устойчивостью. *S. aureus* № 228 - клинический метициллинрезистентный штамм, устойчивый к бета-лактамам, *E. coli* № 603 - клинический штамм, устойчивый к бета-лактамам и сульфаниламидам.

Отбор клинических штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA) и *Escherichia coli* (ESBL) с различными типами резистентности проведен на базе АО «Центральная клиническая больница», г. Алматы. Идентификация клинических штаммов условно-патогенных возбудителей инфекций и определение их резистентности к лекарственным препаратам выполнены на автоматическом бактериологическом анализаторе «MINI API» фирмы «BIO MERIEUX».

Антибактериальную активность определяли методом диффузии в агар (агаровых блоков) на питательном агаре фирмы Hi-Media. Для оценки антагонистических свойств, с помощью стандартного бура (d=7 мм), готовили агаровые блоки культур экстремофильных актиномицетов, выросших на 3 вариантах модифицированного агара Беннета. Затем агаровые блоки помещали в чашки Петри с питательным агаром, засеянном глубинным ростом тест-микроорганизмами (КОЕ 10⁶/мл). В качестве контроля использовали

стерильные чистые питательные среды. Диаметр зон подавления роста бактериальных тест-микроорганизмов измеряли после инкубирования при температуре 37°C в течение 24 часов. Все исследования выполняли в трех повторностях.

Все данные (три повтора) подвергали статистическому анализу, который проводили с использованием пакета программ «Statistica 10.0» [17]. Статистический анализ проводили путем расчета средних значений и стандартных отклонений результатов. Все статистические результаты с $P < 0,05$ считались статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Изучены антибактериальные свойства 667 изолятов экстремофильных актиномицетов в отношении клинических штаммов грамположительных (*S. aureus* № 228) и грамотрицательных (*E. coli* № 603) условно-патогенных возбудителей инфекций с лекарственной устойчивостью. Полученные данные по антибактериальным свойствам экстремофильных актиномицетов представлены в таблице 1 и на рисунках 1–4. В таблице приведены данные по изолятам, проявляющим антибактериальную активность в экстремальных условиях.

Таблица 1 – Антагонистические свойства экстремофильных актиномицетов в отношении грамположительных (*S. aureus* № 228) и грамотрицательных (*E. coli* № 603) клинических условно-патогенных возбудителей инфекций

Порядковый номер	Номер штамма	Диаметр зоны подавления роста тест-микроорганизма, мм		
		Среда № 1	Среда № 2	Среда № 3
1	2	3	4	5
1	2/4/1	16,3±0,5/0	12,6±0,1/0	15,1±0,5/0
2	2/5/4	12,4±0,7/0	12,0±0,4/0	15,9±0,2/0
3	1/11/1	0	15,4±0,7/0	0
4	1/11/5	0	16,1±0,1/0	12,3±0,5/0
5	1/15/3	20,2±0,2/0	20,4±0,2/20,3±0,5	20,4±0,3/15,8±0,1
6	1/15/7	0	20,6±0,4/0	нет роста
7	2/15/1	0	22,0±0,5/23,4±0,7	0
8	2/15/2	0	0/25,3±0,7	0
9	2/15/4	20,6±0,8/0	17,3±0,8/0	12,0±0,4/0
10	2/15/5	17,4±0,6/0	20,5±0,9/0	10,7±0,2/0
11	3/15/1	нет роста	11,3±0,7/0	15,2±0,3/0
12	1/16/2	15,2±0,6/0	20,5±1,0/0	11,0±0,1/0
13	2/16/3	17,3±0,5/17±0,1	25,7±0,5/14,0±0,3	15,4±0,5/0
14	3/16/1	нет роста	30,4±0,5/25,2±0,6	20,1±0,5/10,6±0,1
15	2/18/1	15,9±0,1/0	25,6±0,5/0	17,3±0,1/0
16	2/20/1	10,2±0,5/0	17,2±0,8/0	0
17	1/21/1	19,4±0,1/0	22,2±0,2/0	0
18	1/21/4	15,2±0,3/0	15,1±0,1/0	20,0±0,3/0
19	1/21/6	17,8±1,5/0	22,4±0,1/0	18,7±0,2/0
20	2/21/2	20,3±0,5/0	11,0±0,2/0	0
21	2/21/3	12,0±0,1/0	18,5±0,5/0	0
22	2/22/1	15,5±0,2/0	20,4±0,1/0	15,2±0,1/0
23	2/22/2	20,1±0,1/0	22,6±0,8/0	15,4±0,7/0
24	3/22/3	15,1±0,7/0	15,0±0,4/0	14,8±1,0/0
25	2/23/3	20,6±0,7/0	25,1±0,2/0	30,7±0,5/0
26	1/26/6	15,4±0,1/23,5±0,1	0/15,3±0,4	0/12,1±0,2
27	2/27/2	23,3±0,2/0	0	15,8±0,1/0
28	2/29/2	25,7±0,1/0	25,2±1,3/0	15,4±0,9/0
29	2/29/3	20,3±0,1/20,4±1,2	17,1±0,6/16,5±0,3	13,1±0,1/18,7±0,5
30	2/29/5	20,3±0,5/20,6±0,4	24,0±0,1/22,4±0,5	20,6±1,5/20,9±0,1
31	2/31/1	12,4±1,1/0	16,3±0,1/0	0

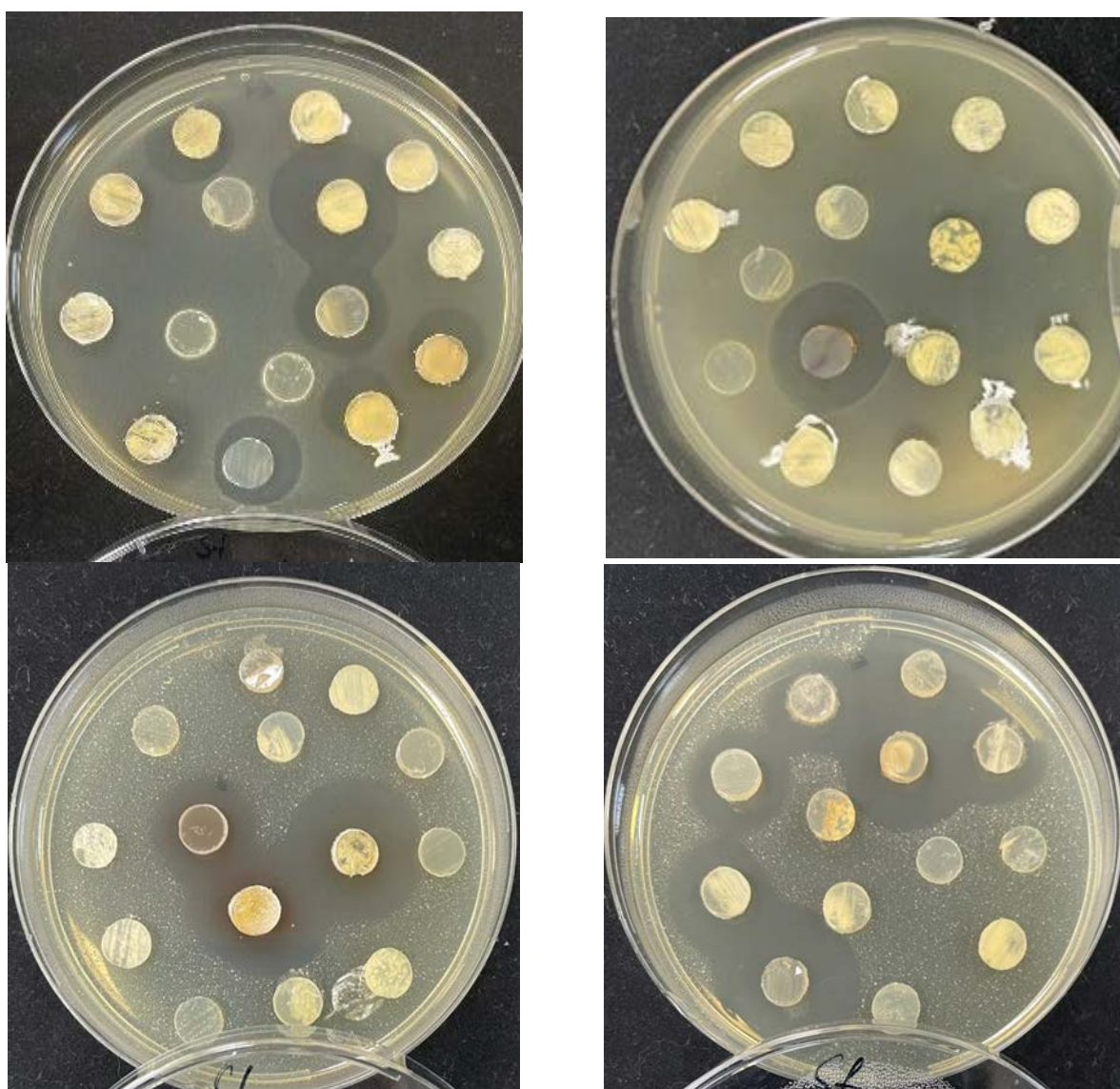
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
32	3/31/1	20,7±0,2/0	20,1±1,3/0	20,5±1,4/0
33	2/33/4	19,5±0,1/0	10,0±0,5/0	0
34	2/33/5	22,4±0,4/0	25,1±0,1/0	25,5±0,1/0
35	1/34/3	15,2±0,8/0	30,3±0,5/0	0
36	3/34/1	нет роста	0	22,4±0,2/0
37	1/37/1	28,0±1,0/28,3±0,5	25,5±0,2/25,3±0,1	15,7±0,4/16,0±0,3
38	1/37/2	25,0±1,5/0	30,4±0,5/0	25,8±0,1/0
39	1/37/3	20,1±0,2/0	20,3±0,5/17,5±0,1	15,3±0,4/0
40	1/37/7	12,4±0,1/0	19,9±0,2/0	12,6±0,5/0
41	2/37/4	0	0/25,5±0,1	0/11,0±0,5
42	3/37/1	0	14,6±0,1/0	0
43	2/38/1	0	нет роста	15,4±0,7/0
44	2/39/3	20,0±0,3/0	30,4±0,2/0	20,3±0,2/0
45	3/39/1	0	0	15,0±0,1/0
46	1/40/2	0	12,5±0,5/0	0
47	2/49/2	0	12,8±0,4/0	0
48	3/50/5	0	0	15,2±0,3/0
49	1/51/1	10,2±0,1/0	10,2±0,4/0	30,3±1,1/15,4±0,7
50	2/51/1	0	0	15,3±0,7/0
51	1/51/5	15,5±0,5/0	0	11,4±0,2/0
52	2/51/2	0	0	17,8±0,1/0
53	2/51/3	0	11,6±0,5/0	20,5±1,0/15,1±0,1
54	2/53/1	15,0±0,1/0	20,4±1,5/0	0
55	2/54/1	15,0±0,2/0	15,3±0,1/0	0
56	2/55/1	0	13,3±0,1/0	15,2±0,5/0
57	3/55/1	10,3±0,1/0	17,9±0,5/0	0
58	1/58/1	0	15,4±0,1/0	нет роста
59	3/58/3	0	12,0±0,5/0	15,2±0,1/0
60	1/59/3	15,7±0,1/0	15,5±0,2/0	нет роста
61	2/59/1	0	19,3±0,5/0	12,5±0,1/0
62	2/59/4	15,4±0,7/0	18,8±1,5/0	нет роста
63	3/59/1	15,2±0,1/0	17,2±0,1/0	нет роста
64	3/59/2	10,0±0,0/0	12,3±0,9/0	нет роста
65	1/60/2	25,4±0,6/0	25,7±1,5/0	нет роста
66	1/60/4	12,0±0,3/0	18,6±0,2/0	нет роста
67	2/60/3	23,3±0,5/0	25,6±0,1/0	18,5±0,1/0
68	3/60/1	25,4±0,1/0	25,5±0,2/0	нет роста
69	3/66/1	22,6±0,2/0	15,2±0,1/0	17,3±0,5/0
70	1/67/1	0	17,1±0,4/0	13,0±0,1/0
71	3/67/1	0	30,6±1,5/0	12,4±0,5/0
72	2/69/1	27,9±1,5/0	25,2±0,2/0	20,5±0,3/0
73	2/69/2	14,3±0,1/0	12,1±0,5/0	12,1±0,1/0
74	2/69/5	13,0±0,5/0	12,4±0,5/0	12,3±0,4/0
75	3/72/2	12,3±0,5/0	12,2±0,2/0	0
76	1/73/1	0	0	16,2±0,7/0
77	3/73/1	12,0±0,1/0	10,1±0,1/0	нет роста
78	1/75/3	25,3±0,2/0	25,3±1,3/0	0
79	1/75/5	25,4±1,5/0	20,7±0,5/0	20,6±0,1/0
80	1/75/6	18,7±0,5/0	25,6±0,5/0	нет роста
81	1/76/1	12,4±0,4/0	21,5±0,2/0	нет роста
82	2/76/2	12,1±0,4/0	13,6±0,1/0	0
83	3/77/1	12,4±0,2/0	15,0±0,2/0	нет роста

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
84	1/78/2	20,6±1,9/0	20,4±0,1/0	20,7±1,2/0
85	1/79/1	0	0	18,3±0,6/0
86	1/79/2	12,7±0,5/0	11,3±0,2/0	12,5±0,8/0
87	1/79/4	12,0±0,4/0	15,8±0,3/0	12,6±0,8/0
88	1/79/8	0	0	15,3±0,5/0
89	3/79/5	0	0	25,2±0,7/0
90	1/88/1	25,2±0,1/0	20,9±0,5/0	нет роста
91	1/89/1	15,1±0,7/0	15,3±0,1/0	нет роста
92	2/89/2	0	20,4±0,2/0	30,1±0,2/0
93	1/92/2	20,6±0,4/0	25,2±0,1/0	0
94	1/93/1	25,3±0,2/0	20,5±0,2/0	25,8±0,9/0
95	3/94/2	0	0	20,1±1,0/15,1±0,4

Примечание: в числителе – диаметр зоны подавления роста *S. aureus* № 228, в знаменателе – диаметр зоны подавления роста *E. coli* № 603, 0 – активность отсутствует



Рисунки 1–4 - Антагонистические свойства экстремофильных актиномицетов в отношении *S. aureus* № 228 (MRSA)

Принято считать, что галофильные актиномицеты в будущем станут ценным ресурсом для новых продуктов, представляющих промышленный интерес, включая противомикробные, цитотоксические, нейротоксические, антимиотические, противовирусные и противоопухолевые препараты [10]. Из экстремальных условий уже описаны различные биоактивные метаболиты, такие как пиростатины, салиноспорамиды, абиссомицины, триоксакарцин А, гутингимицин, споролиды, мариномицины, гималамицины, диазепиномицин, хелхинолин, ладжолламицин, тетродотоксин, мехерчармицины, цианримицины и другие.

Изучение антагонизма экстремофильных актиномицетов различными исследователями показывает разнообразие антибактериальные свойства, как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных условно-патогенных возбудителей инфекций. В ходе исследований по открытию новых природных продуктов из экстремофильных актиномицетов были получены новые линейные поликетиды и актинополиспорины А, В и С из галофильного актиномицета *Actinopolyspora erythraea* YIM 90600 [18]. Из галофильного актиномицета *Nocardiosis gilva* YIM 90087 выделены и охарактеризованы *n*-терфенилы с противогрибковой, антибактериальной и антиоксидантной активностью [19]. Описан новый антибиотик антрацимицин, который вырабатывается актиномицетами морского происхождения в солевой среде [20]. Антимикробный хинолиновый алкалоид был выделен из нового галофильного актиномицета *Nocardiosis terrae* YIM 90022 [21]. 18 видов рода *Streptomyces* выделены из засоленных экосистем Непала, 12 изолятов проявили антибактериальную активность против бета-лактамаз расширенного спектра (ESBL), продуцируемых *E. coli* [22]. Новые антибиотики, такие как хиникомицин и ладжолламицин, обнаружены у галофильных и галотолерантных видов актиномицетов [10]. *Streptomyces* spp. AJ8, выделенный из донных отложений солеварен в Индии, обладал сильным антагонистическим действием против *S. aureus*, *A. hydrophila* и *C. albicans* [23]. Из солончака на юге Индии изолирован штамм *Streptomyces* VITSVK5 spp., образующий биологически активное вещество из группы пирролидинов с высокой активностью в отношении *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. fumigatus* и *A. niger* [24]. Четыре изолята *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flaveous*, *Streptomyces plicatus*, и *Streptomyces griseoruber*, выделенные из засоленных и щелочных почв Египта, показали высокие антимикробные антагонистические свойства [25].

Полученные нами данные так же, как и данные литературы, демонстрируют разнообразие антибактериальных свойств экстремофильных актиномицетов из необычных экосистем Казахстана. Анализ полученных нами результатов показал, что 111 (16,6 %) изолятов экстремофильных актиномицетов проявили антибактериальные свойства против изученных грамположительных (*S. aureus* № 228) и 14 (2,1%) изолятов - против грамотрицательных (*E. coli* № 603) тест-микроорганизмов. Изоляты экстремофильных актиномицетов проявили антибактериальную активность в экстремальных условиях роста, что свидетельствует об их перспективности для дальнейшего исследования.

Наиболее высокую активность в экстремальных условиях роста против *S. aureus* № 228 проявили изоляты №№ 3/16/1, 1/34/3, 1/37/2, 2/39/3, 1/51/1, 3/67/1, 2/89/2 (диаметр зоны подавления роста - до 30,1±0,2 мм), против *E. coli* № 603 – изоляты №№ 2/15/2, 3/16/1, 1/37/1, 2/37/4 (диаметр зоны подавления роста - до 25,5±0,1 мм).

99 изолятов (87,6%) актиномицетов из 113 изолятов с обнаруженной антибактериальной активностью имели узкий спектр антагонистического действия против грамположительных тест-микроорганизмов (*S. aureus* № 228) и только 2 изолята (1,8%) проявили узкий спектр действия к грамотрицательным условно-патогенным бактериям (*E. coli* № 603). 12 изолятов (10,6%) экстремофильных актиномицетов с антибактериальными свойствами обладали широким спектром антибактериального действия и были активны одновременно к грамположительным (*S. aureus* № 228) и к грамотрицательным (*E. coli* № 603) условно-патогенным возбудителям инфекций.

11 изолятов актиномицетов проявили активность только в экстремальных условиях роста (при росте, как на среде 2 с 3,5% NaCl, pH 7,0 так и в щелочных условиях – при росте на среде 3 с 0,35% NaHCO₃, pH 9,0): №№ 1/11/5, 3/15/1, 3/16/1, 2/37/4, 2/51/3, 2/55/1, 3/58/3, 2/59/1, 1/67/1, 3/67/1, 2/89/2. Изоляты №№ 2/51/3 и 2/89/2 проявили в экстремальных условиях роста высокую антибактериальную активность в отношении грамположительных условно-патогенных бактерий (*S. aureus* № 228, MRSA), активность также наиболее выражена в щелочных условиях роста - диаметр зоны подавления роста – 20,5±1,0-30,1±0,2 мм. Изолят № 2/37/4 имел узкий спектр действия против грамотрицательных бактерий, диаметр зоны подавления роста *E. coli* № 603 на среде 2 составил 25,5±0,1 мм. Изолят № 3/16/1 проявил широкий спектр действия с высоким уровнем активности только в экстремальных условиях роста – при росте на среде 2 (3,5% NaCl) зона подавления роста *S. aureus* № 228 составляла 30,4±0,5 мм, *E. coli* № 603 – 25,2±0,6 мм.

18 изолятов актиномицетов проявили антибактериальную активность при росте только в одной экстремальной среде: №№ 1/11/1, 2/15/1, 2/15/2, 1/15/7, 3/37/1, 1/40/2, 2/49/2, 1/58/1 - на среде 2; №№ 3/34/1, 3/39/1, 3/50/5, 2/51/1, 2/51/2, 1/73/1, 1/79/1, 1/79/8, 3/79/5, 3/94/2 - на среде 3. Изолят № 2/15/2 имеет узкий спектр действия в отношении грамотрицательных тест-микроорганизмов (*E. coli* № 603), активность выявлена при росте на среде 2 – диаметр зоны подавления роста – 25,3±0,7 мм. Высокую активность в отношении грамположительных бактерий на среде 2 проявил изолят № 1/15/7 - диаметр зоны подавления роста – 20,6±0,4 мм (*S. aureus* № 228). Изолят № 3/79/5 проявил самую высокую активность на среде 3 - диаметр зоны подавления роста 25,2±0,7 мм (*S. aureus* № 228). Изолят № 2/15/1 проявил широкий спектр антибактериального действия на среде 2, диаметр зоны подавления роста *S. aureus* № 228 – 22,0±0,5 мм, *E. coli* № 603 – 23,4±0,7 мм.

Полученные результаты соотносятся с данными литературы по активности актиномицетов, выделенных из экстремальных экосистем различных зон Земли. Из солеварен (Джайпур, Индия) выделены изоляты актиномицетов, проявившие активность против *S. aureus* (диаметр зоны подавления роста – 15±0,57 - 35±0,88 мм) [26]. Изоляты актиномицетов, полученные из солончаковых почв Марокко [27], проявили активность при росте на среде Беннета против *S. aureus* (диаметр зоны подавления роста – 20,3±0,5 мм), *E. coli* (13±1 мм). 21 изолятов, полученных из образца засушливой почвы Южной Африки проявили активность против *S. aureus* с зонами ингибирования от 16 до 40 мм, против *E. coli* (ToIC) (7 изолятов) с зонами ингибирования 12-20 мм [28]. 8 изолятов, выделенных из из засоленной почвы Алжира продемонстрировали противомикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, диаметр зон подавления роста варьировал от 16 до 45 мм [29].

Заключение

Из экстремальных экосистем Казахстана выделены 667 изолятов гало-, алкалофильных, а также толерантных к солям и pH экстремофильных актиномицетов, которые обладают потенциальной возможностью синтезировать новые природные продукты для медицины. Для 113 изолятов экстремофильных актиномицетов, выделенных из Северного, Западного и Южного Казахстана, установлено наличие антибактериальных свойств: 111 изолятов проявили активность против клинического штамма *S. aureus* № 228 (MRSA), 14 изолятов экстремофильных актиномицетов - против клинического штамма *E. coli* № 603. Наряду с узким спектром антибактериального действия большинства штаммов экстремофильных актиномицетов, 12 изолятов обладали широким спектром действия и были активны одновременно к грамположительным (*S. aureus* № 228) и к грамотрицательным (*E. coli* № 603) условно-патогенным возбудителям инфекций. Изоляты экстремофильных актиномицетов с антибактериальными свойствами в экстремальных условиях роста отобраны для дальнейших исследований, как перспективные продуценты новых природных соединений для медицины.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Комитета Науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № AP14869253).

Литература:

- 1 Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* 2017, 34(10):1203–1232 (doi: 10.1039/c7np00026j)
- 2 Fair R.J., Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect. Med. Chem.* 2014, 6:25–64 (doi: 10.4137/PMC.S14459)
- 3 Butler, M. S., Blaskovich, M. A., and Cooper, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J. Antibiot.* 2013, 66, 571–591. doi: 10.1038/ja.2013.86
- 4 Demain A.L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* 2009, 62:5–16 (doi: 10.1038/ja.2008.16)
- 5 Katz L., Baltz R.H. Natural product discovery: past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 43:155–176 (doi: 10.1007/s10295-015-1723-5)
- 6 Krug D., Muller R. Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products. *Nat. Prod. Rep.* 2014, 31:768–783 (doi: 10.1039/c3np70127a)
- 7 Walsh C. Where will new antibiotics come from? *Nature Rev. Microbiol.* 2003, 1:65–70 (doi: 10.1038/nrmicro727)
- 8 Tulp M., Bohlin L. Rediscovery of known natural compounds: nuisance or goldmine? *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13:5274–5282 (doi: 10.1016/j.bmc.2005.05.067)
- 9 Peraud O., Biggs J. S., Huguen R. W., Light A. R., Concepcion G. P., et al. Microhabitats within venomous cone snails contain diverse Actinobacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 2009, 75:6820–6826 (doi: 10.1128/AEM.01238-09)
- 10 Hamed J., Mohammadipanah F., Ventosa A. Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles.* 2013, 17:1–13 (doi: 10.1007/s00792-012-0493-5)
- 11 Jose P. A., Sivakala K. K., Jebakumar S. R. D. Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces* sp. JAJ06. *Int. J. Microbiol.* 2013:526260. (doi: 10.1155/2013/526260)
- 12 Yuan M., Yu Y., Li H.-R., Dong N., Zhang, X.-H. Phylogenetic diversity and biological activity of actinobacteria isolated from the chukchi shelf marine sediments in the Arctic Ocean. *Mar. Drugs.* 2014, 12:1281–1297 (doi: 10.3390/md12031281)
- 13 Треножникова Л.П., Баймаханова Г.Б., Балгимбаева А.С., Баймаханова Б.Б., Смирнова И.Э., Файзулина Э.Р., Спанкулова Г.А., Татаркина Л.Г., Момбекова Г.А., Елубаева А.Е., Айткельдиева С.А., Глеубекова Д.А. Биотехнологический потенциал экстремофильных актиномицетов для медицины и стратегии его открытия. *Микробиология және вирусология.* 2021, 4(35):4–26. (<https://doi.org/10.53729/MV-AS.2021.04.01>)
- 14 Baltz R.H. Gifted microbes for genome mining and natural product discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 44:573–588 (doi: 10.1007/s10295-016-1815-x)
- 15 Aigle B., Lautru S., Spitteller D., Dickschat J.S., Challis G.L., Leblond P., Pernodet J.L. Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 41:251–263 (doi: 10.1007/s10295-013-1379-y)
- 16 Trenzchnikova L., Azizan A. Discovery of Actinomycetes from Extreme Environments with Potential to Produce Novel Antibiotics. *Cent. Asian J. Glob. Health.* 2018, 7(1):337 (doi: 10.5195/CAJGH.2018.337)
- 17 Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. М.: Горячая линия-Телеком. 2016; 288 с.
- 18 Zhao L.X., Huang S.X., Tang S.K., Jiang C.L., Duan Y., Beutler J.A., et al. Actinopolysporins A–C and Tubercidin as a Pcd4 stabilizer from the halophilic actinomycete *Actinopolyspora erythraea* YIM 90600. *Nat. Prod.* 2011, 74(9):1990–1995 (doi: 10.1021/np200603g)
- 19 Tian S.Z., Pu X., Luo G., Zhao L.X., Xu L.H., Li W.J., et al. Isolation and characterization of new p-Terphenyls with antifungal, antibacterial, and antioxidant activities from halophilic actinomycete *Nocardopsis gilva* YIM 90087. *J. Agr. Food Chem.* 2013, 61(12):3006–3012 (doi: 10.1021/jf400718w)

20 Jang K.H., Nam S.J., Locke J.B., Kauffman C.A., Beatty D.S., Paul L.A., et al. Anthracimycin, a potent Anthrax antibiotic from a marine-derived actinomycete. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013, 52(30):7822–7824 (doi: 10.1002/anie.201302749)

21 Tian S., Yang Y., Liu K., Xiong Z., Xu L., Zhao L. Antimicrobial metabolites from a novel halophilic actinomycete *Nocardiosis terrae* YIM 90022. *Nat. Prod. Res.* 2014, 28(5):344–346 (doi: 10.1080/14786419.2013.858341)

22 Khadayat K., Sherpa D.D., Malla K.P., Shrestha S., Rana N., Marasini B.P., Khanal S., Rayamajhee B., Bhattarai B.R., Parajuli N. Molecular Identification and Antimicrobial Potential of *Streptomyces* Species from Nepalese Soil. *Int. J. Microbiol.* 2020:8817467 (doi: 10.1155/2020/8817467)

23 Jenifer J.S.C.A., Donio M.B.S., Michaelbabu M., et al. Haloalkaliphilic *Streptomyces* spp. AJ8 isolated from solar salt works and its' pharmacological potential. *AMB Expr.* 2015, 5(1):143 (doi: 10.1186/s13568-015-0143-2)

24 Saurav K., Kannabiran K. In vitro activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. against fungal and bacterial human pathogens. *Revista Iberoamericana de Micología.* 2012, 29(1):29-33 (doi: 10.1016/j.riam.2011.06.008)

25 Hozzein W.N., Ali M.I., Ahmad M.S. Antimicrobial activities of some alkaliphilic and alkaline-resistant microorganisms isolated from Wadi Araba, the eastern desert of Egypt. *J. Life Sci.* 2013, 10(4):1823-1828 (<https://www.researchgate.net/publication/288289450>)

26 Jose P.A., Jebakumar S.R. Phylogenetic appraisal of antagonistic, slow growing actinomycetes isolated from hypersaline inland solar salterns at Sambhar salt Lake, India. *Front. Microbiol.* 2013, 10;4:190 (doi: 10.3389/fmicb.2013.00190)

27 El Karkouri A., Assou S.A., El Hassouni M. Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from an extreme Moroccan biotope. *Pan Afr. Med. J.* 2019, 29;33:329 (doi: 10.11604/pamj.2019.33.329.19018)

28 Charousová I., Medo J., Hleba L., Císarová M., Javoreková S. Antimicrobial activity of actinomycetes and characterization of actinomycin-producing strain KRG-1 isolated from Karoo, South Africa. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2019, 55. (doi: 10.1590/s2175-97902019000217249)

29 Belkacem I., Hakim D., Ramzi S. Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Saline Soil Samples with Antimicrobial Activities against Microbial Pathogens. *South Asia J. of Experivental Biology.* 2023, 13(2):114-124 (doi: [https://doi.org/10.38150/sajeb.13\(2\).p114-124](https://doi.org/10.38150/sajeb.13(2).p114-124))

Г.Б. БАЙМАХАНОВА¹, Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹, Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹,
Г.А. МОМБЕКОВА¹, Б.Б. БАЙМАХАНОВА¹, А.С. БАЛГИМБАЕВА^{1*},
Д.А. ТЛЕУБЕКОВА¹, М.А. АҚЫЛОВА², А.Х. СЕРИКОВА², Ш.Ж. ДАУРЕНБЕКОВА³,
Т.Д. ДООЛОТКЕЛЬДИЕВА⁴, Л.П. ТРЕНОЖНИКОВА¹

¹Микробиология және вирусология ғылыми- өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Орталық клиникалық больница, Алматы, Қазақстан

³І. Жансүгіров атындағы жетісу университеті, Талдықорған, Қазақстан

⁴Қырғыз-Түрік «Манас» университеті, Бішкек, Қырғызстан

*e-mail: imv_rk@list.ru

ҚАЗАҚСТАННЫҢ ЭКСТРЕМАЛЬДІ ЖЕРЛЕРІНДЕ МЕКЕНДЕЙТІН АКТИНОМИЦЕТТЕРДІҢ АНТИБАКТЕРИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Түйін

Кеңінен қолданылатын антибиотикалық терапия бірқатар жағымсыз салдарға ие, олардың бірі микроорганизмдердің жақында сәтті қолданылған препараттарға көп төзімділігін қалыптастыруда көрінеді. Антибиотиктердің жаңа кластарының болмауы, оларға жұқпалы қоздырғыштардың төзімділігінің жоғарылауымен бірге жаңа мақсаттары мен әсер ету механизмдері бар және тиімділігін жоғалтатын препараттарды алмастыра алатын жаңа табиғи қосылыстарды дереу тексеруді талап етеді. Фармацевтикада қолдану үшін актинобактериялар жаңа және өмірлік маңызды биологиялық белсенді метаболиттердің көптеген көзі болып табылады. Мақалада Қазақстанның тұзды топырақтарынан және көлдер бөлінген актиномицеттер изоляттарының бактерияға қарсы қасиеттерін зерттеу нәтижелері берілген. Экстремофильді актиномицеттердің

зерттеген кезде 111 (16,6%) изоляттары грам-оң (*S. aureus*, MRSA) және 14 (2,1%) изоляттары грам-теріс (*E. coli*) сынамалы микроорганизмдерге қарсы антибактериялық қасиеттер көрсетті. Бактерияға қарсы қасиеттері бар экстремофильді актиномицеттердің 12 изоляттары (10,6%) белсенділіктің кең спектріне ие болды және шартты-патогенді жұқпалы ауруды қоздырғыш грам-оң (*S. aureus*) және грам-теріс (*E. coli*) микроорганизмдерге қарсы бір мезгілде белсенді болды. Медицина үшін жаңа табиғи қосылыстардың перспективті продуценттері ретінде одан әрі зерттеу үшін экстремалды өсу жағдайында бактерияға қарсы қасиеттері бар экстремофильді актиномицеттердің изоляттары таңдалды.

Кілтті сөздер: актиномицеттер, антибиотиктер, бактерияға қарсы қасиеттер, әсер ету спектрі, шартты-патогенді бактериялар.

IRSTI: 34.27.19

G.B. BAIMAKHANOVA¹, E.R. FAIZULINA¹, L.G. TATARKINA¹, G.A. SPANKULOVA¹,
G.A. MOMBEKOVA¹, B.B. BAIMAKHANOVA¹, A.S. BALGIMBAYEVA^{1*},
D.A. TLEUBEKOVA¹, M.A. AKYLOVA², A.H. SERIKOVA², Sh.Zh. DAURENBEKOVA³,
T.D. DOOLOTKELDIEVA⁴, L.P. TRENOZHNIKOVA¹

¹Research and Production Center of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Central Clinical Hospital, Almaty, Kazakhstan

³I. Zhansugurova Zhetysu University, Taldykorgan, Kazakhstan

⁴Kyrgyz-Turkish Manas University, Bishkek, Kyrgyzstan

*e-mail: imv_rk@list.ru

STUDY OF ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF ACTINOMYCETES FROM EXTREME HABITATS OF KAZAKHSTAN

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.12

Abstract

The widely applied antibiotic therapy has a variety of negative consequences, one of which is manifested in the formation of multiple resistance of microorganisms to recently successfully applied drugs. The lack of new classes of antibiotics combined with increased resistance to them by infectious agents requires immediate screening of new natural compounds that have new targets and mechanisms of action and can replace drugs that are losing their effectiveness. Actinobacteria represent a numerous source of new and vital bioactive metabolites for pharmaceutical use. The article presents the results of a study of the antibacterial properties of actinomycete isolates isolated from saline soils and saline lakes of Kazakhstan. 111 (16.6%) isolates of extremophilic actinomycetes showed antibacterial properties against the studied gram-positive (*S. aureus*, MRSA) and 14 (2.1%) isolates - against gram-negative (*E. coli*) test microorganisms. 12 isolates (10.6%) of extremophilic actinomycetes with antibacterial properties had a wide spectrum of activity and were active simultaneously against gram-positive (*S. aureus*) and gram-negative (*E. coli*) opportunistic pathogens. Isolates of extremophilic actinomycetes with antibacterial properties under extreme growth conditions were selected for further research as promising producers of new natural compounds for medical applications.

Keywords: actinomycetes, antibiotics, antibacterial properties, spectrum of action, opportunistic bacteria.

The resistance of microorganisms is the reason for the intensification of the search for new antibacterial agents as an effective way to overcome this phenomenon [1-3]. Actinobacteria represent a numerous source of new and vital bioactive metabolites for pharmaceutical use [4]. There is a constant interest in the search for new natural biologically active products necessary for the development of innovative biotechnology and pharmacology [5-8].

Recently, it has been hypothesised that the diversity of actinomycetes in poorly studied unusual environments may increase the prospects for the discovery of new compounds with

potential activity that can overcome multidrug resistance and be promising for the treatment of chronic diseases, cancer, and viral infections [9-13]. Therefore, extreme microbial habitats are currently considered the most interesting for biotechnological research and are regarded as a rich source of new specialized metabolites. However, studies on the screening of natural antibiotics from extreme habitats have shown that actinomycetes with neutrophilic properties, which may be well-studied producers of known natural antibiotics, are isolated in large numbers from these sources. Many actinomycetes possess sets of BGC biosynthetic gene clusters encoding pathways for the production of valuable secondary metabolites that can only be switched on under specific conditions. Recent genomic approaches have shown that a single *Streptomyces* strain can have an average of 30 to 50 BGC clusters, which can account for 8-10% of its genome [14, 15]. This demonstrates how difficult modern screening for new natural antibiotics can be and how often it can yield inconclusive results, even when using unusual and extreme sources.

The new screening program we have developed, based on the classification of actinomycetes under natural growth conditions, allows researchers to focus their efforts on studying strains that belong to specific groups [16]. Additionally, it provides an opportunity to create conditions for the targeted expression of "silent" genes responsible for biosynthesizing new pharmaceutically valuable substances using certain natural factors.

The aim of this work was to study the antibacterial properties of actinomycetes isolated from unusual ecosystems in Kazakhstan under extreme growth conditions, including salinity and pH, in accordance with our newly developed screening program.

Materials and methods of research

The objects of the study were 667 isolates of extremophilic actinomycetes obtained from extremal ecosystems of Northern, Western and Southern Kazakhstan (salt marshes, solonchaks, rhizosphere of salt-tolerant plants, saline lakes).

To determine the antibacterial activity, isolates of extremophilic actinomycetes were cultivated on 3 versions of modified Bennett agar (№№ 1, 2, 3) at a temperature of 28–29°C for 10 days in a Binder thermostat.

Composition of variants of modified Bennett agar, (%):

Medium № 1: glucose - 0.2; yeast extract - 0.1; peptone - 0.2; agar - 2.0; pH 7.2;

Medium № 2: glucose - 0.2; yeast extract - 0.1; peptone - 0.2; NaCl - 3.5; agar - 2.0; pH 7.2;

Medium № 3: glucose - 0.2; yeast extract - 0.1; peptone - 0.2; NaHCO₃ - 0.35; agar - 2.0; pH 9.0.

"To study the antibacterial properties of isolates, we used clinical strains of gram-positive (*Staphylococcus aureus*, strain № 228) and gram-negative (*Escherichia coli*, strain № 603) opportunistic pathogens with drug resistance. *Staphylococcus aureus* strain № 228 is a clinical methicillin-resistant strain resistant to beta-lactams, while *Escherichia coli* strain № 603 is a clinical strain resistant to beta-lactams and sulfonamides.

The selection of these clinical strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Escherichia coli* (ESBL) with different types of resistance was carried out at the JSC Central Clinical Hospital in Almaty. The identification of clinical strains of opportunistic pathogens and the determination of their drug resistance were performed using an automatic bacteriological analyzer, "MINI API," manufactured by the company "BIO MERIEUX."

Antibacterial activity was determined using the agar diffusion method (agar blocks) on Hi-Media nutrient agar. To evaluate antagonistic properties, agar blocks of cultures of extremophilic actinomycetes grown on three variants of modified Bennett's agar were prepared using a standard drill (d=7 mm). These agar blocks were then placed in Petri dishes with nutrient agar seeded with deep growth test microorganisms (CFU 10⁶/ml). Sterile pure nutrient media were used as a control. The diameter of the growth suppression zones of bacterial test microorganisms was measured after incubation at 37°C for 24 hours. All studies were performed in triplicate.

All data (from three repetitions) underwent statistical analysis using the software package "Statistica 10.0" [17]. Statistical analysis involved calculating the mean values and standard deviations of the results. Results with a P-value < 0.05 were considered statistically significant.

Results and discussion

The antibacterial properties of 667 isolates of extremophilic actinomycetes against clinical strains of gram-positive (*S. aureus* № 228) and gram-negative (*E. coli* № 603) opportunistic pathogens with drug resistance were studied. The data obtained on the antibacterial properties of extremophilic actinomycetes are presented in Table 1 and in Figures 1–4. The table shows data on isolates exhibiting antibacterial activity under extreme conditions.

Table 1 - Antagonistic properties of extremophilic actinomycetes against gram-positive (*S. aureus* № 228) and gram-negative (*E. coli* № 603) clinical opportunistic pathogens

Serial number	Isolate number	Diameter of the growth inhibition zone of the test-microorganism, mm		
		Medium № 1	Medium № 2	Medium № 3
1	2	3	4	5
1	2/4/1	16,3±0,5/0	12,6±0,1/0	15,1±0,5/0
2	2/5/4	12,4±0,7/0	12,0±0,4/0	15,9±0,2/0
3	1/11/1	0	15,4±0,7/0	0
4	1/11/5	0	16,1±0,1/0	12,3±0,5/0
5	1/15/3	20,2±0,2/0	20,4±0,2/20,3±0,5	20,4±0,3/15,8±0,1
6	1/15/7	0	20,6±0,4/0	no growth
7	2/15/1	0	22,0±0,5/23,4±0,7	0
8	2/15/2	0	0/25,3±0,7	0
9	2/15/4	20,6±0,8/0	17,3±0,8/0	12,0±0,4/0
10	2/15/5	17,4±0,6/0	20,5±0,9/0	10,7±0,2/0
11	3/15/1	no growth	11,3±0,7/0	15,2±0,3/0
12	1/16/2	15,2±0,6/0	20,5±1,0/0	11,0±0,1/0
13	2/16/3	17,3±0,5/17±0,1	25,7±0,5/14,0±0,3	15,4±0,5/0
14	3/16/1	no growth	30,4±0,5/25,2±0,6	20,1±0,5/10,6±0,1
15	2/18/1	15,9±0,1/0	25,6±0,5/0	17,3±0,1/0
16	2/20/1	10,2±0,5/0	17,2±0,8/0	0
17	1/21/1	19,4±0,1/0	22,2±0,2/0	0
18	1/21/4	15,2±0,3/0	15,1±0,1/0	20,0±0,3/0
19	1/21/6	17,8±1,5/0	22,4±0,1/0	18,7±0,2/0
20	2/21/2	20,3±0,5/0	11,0±0,2/0	0
21	2/21/3	12,0±0,1/0	18,5±0,5/0	0
22	2/22/1	15,5±0,2/0	20,4±0,1/0	15,2±0,1/0
23	2/22/2	20,1±0,1/0	22,6±0,8/0	15,4±0,7/0
24	3/22/3	15,1±0,7/0	15,0±0,4/0	14,8±1,0/0
25	2/23/3	20,6±0,7/0	25,1±0,2/0	30,7±0,5/0
26	1/26/6	15,4±0,1/23,5±0,1	0/15,3±0,4	0/12,1±0,2
27	2/27/2	23,3±0,2/0	0	15,8±0,1/0
28	2/29/2	25,7±0,1/0	25,2±1,3/0	15,4±0,9/0
29	2/29/3	20,3±0,1/20,4±1,2	17,1±0,6/16,5±0,3	13,1±0,1/18,7±0,5
30	2/29/5	20,3±0,5/20,6±0,4	24,0±0,1/22,4±0,5	20,6±1,5/20,9±0,1
31	2/31/1	12,4±1,1/0	16,3±0,1/0	0
32	3/31/1	20,7±0,2/0	20,1±1,3/0	20,5±1,4/0
33	2/33/4	19,5±0,1/0	10,0±0,5/0	0
34	2/33/5	22,4±0,4/0	25,1±0,1/0	25,5±0,1/0
35	1/34/3	15,2±0,8/0	30,3±0,5/0	0
36	3/34/1	no growth	0	22,4±0,2/0

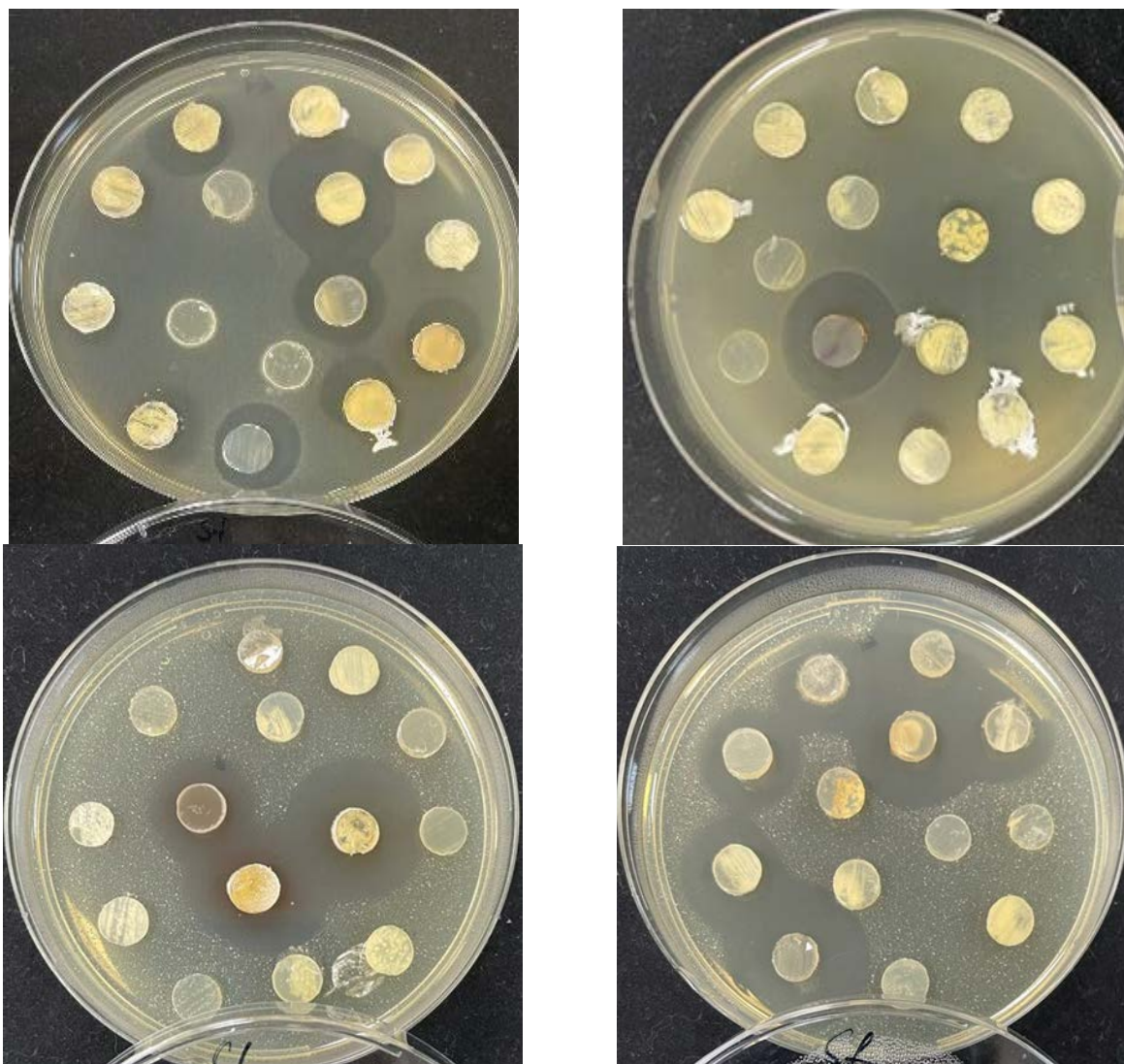
Table 1 continued

1	2	2	4	5
37	1/37/1	28,0±1,0/28,3±0,5	25,5±0,2/25,3±0,1	15,7±0,4/16,0±0,3
38	1/37/2	25,0±1,5/0	30,4±0,5/0	25,8±0,1/0
39	1/37/3	20,1±0,2/0	20,3±0,5/17,5±0,1	15,3±0,4/0
40	1/37/7	12,4±0,1/0	19,9±0,2/0	12,6±0,5/0
41	2/37/4	0	0/25,5±0,1	0/11,0±0,5
42	3/37/1	0	14,6±0,1/0	0
43	2/38/1	0	no growth	15,4±0,7/0
44	2/39/3	20,0±0,3/0	30,4±0,2/0	20,3±0,2/0
45	3/39/1	0	0	15,0±0,1/0
46	1/40/2	0	12,5±0,5/0	0
47	2/49/2	0	12,8±0,4/0	0
48	3/50/5	0	0	15,2±0,3/0
49	1/51/1	10,2±0,1/0	10,2±0,4/0	30,3±1,1/15,4±0,7
50	2/51/1	0	0	15,3±0,7/0
51	1/51/5	15,5±0,5/0	0	11,4±0,2/0
52	2/51/2	0	0	17,8±0,1/0
53	2/51/3	0	11,6±0,5/0	20,5±1,0/15,1±0,1
54	2/53/1	15,0±0,1/0	20,4±1,5/0	0
55	2/54/1	15,0±0,2/0	15,3±0,1/0	0
56	2/55/1	0	13,3±0,1/0	15,2±0,5/0
57	3/55/1	10,3±0,1/0	17,9±0,5/0	0
58	1/58/1	0	15,4±0,1/0	no growth
59	3/58/3	0	12,0±0,5/0	15,2±0,1/0
60	1/59/3	15,7±0,1/0	15,5±0,2/0	no growth
61	2/59/1	0	19,3±0,5/0	12,5±0,1/0
62	2/59/4	15,4±0,7/0	18,8±1,5/0	no growth
63	3/59/1	15,2±0,1/0	17,2±0,1/0	no growth
64	3/59/2	10,0±0,0/0	12,3±0,9/0	no growth
65	1/60/2	25,4±0,6/0	25,7±1,5/0	no growth
66	1/60/4	12,0±0,3/0	18,6±0,2/0	no growth
67	2/60/3	23,3±0,5/0	25,6±0,1/0	18,5±0,1/0
68	3/60/1	25,4±0,1/0	25,5±0,2/0	no growth
69	3/66/1	22,6±0,2/0	15,2±0,1/0	17,3±0,5/0
70	1/67/1	0	17,1±0,4/0	13,0±0,1/0
71	3/67/1	0	30,6±1,5/0	12,4±0,5/0
72	2/69/1	27,9±1,5/0	25,2±0,2/0	20,5±0,3/0
73	2/69/2	14,3±0,1/0	12,1±0,5/0	12,1±0,1/0
74	2/69/5	13,0±0,5/0	12,4±0,5/0	12,3±0,4/0
75	3/72/2	12,3±0,5/0	12,2±0,2/0	0
76	1/73/1	0	0	16,2±0,7/0
77	3/73/1	12,0±0,1/0	10,1±0,1/0	no growth
78	1/75/3	25,3±0,2/0	25,3±1,3/0	0
79	1/75/5	25,4±1,5/0	20,7±0,5/0	20,6±0,1/0
80	1/75/6	18,7±0,5/0	25,6±0,5/0	no growth
81	1/76/1	12,4±0,4/0	21,5±0,2/0	no growth
82	2/76/2	12,1±0,4/0	13,6±0,1/0	0
83	3/77/1	12,4±0,2/0	15,0±0,2/0	no growth
84	1/78/2	20,6±1,9/0	20,4±0,1/0	20,7±1,2/0
85	1/79/1	0	0	18,3±0,6/0
86	1/79/2	12,7±0,5/0	11,3±0,2/0	12,5±0,8/0
87	1/79/4	12,0±0,4/0	15,8±0,3/0	12,6±0,8/0

Table 1 continued

1	2	3	4	5
88	1/79/8	0	0	15,3±0,5/0
89	3/79/5	0	0	25,2±0,7/0
90	1/88/1	25,2±0,1/0	20,9±0,5/0	no growth
91	1/89/1	15,1±0,7/0	15,3±0,1/0	no growth
92	2/89/2	0	20,4±0,2/0	30,1±0,2/0
93	1/92/2	20,6±0,4/0	25,2±0,1/0	0
94	1/93/1	25,3±0,2/0	20,5±0,2/0	25,8±0,9/0
95	3/94/2	0	0	20,1±1,0/15,1±0,4

Note: the numerator is the diameter of the growth inhibition zone of *S. aureus* № 228, the denominator is the diameter of the growth inhibition zone of *E. coli* № 603, 0 - no activity



Figures 1-4 - Antagonistic properties of extremophilic actinomycetes against *S. aureus* № 228 (MRSA)

It is generally accepted that halophilic actinomycetes in the future will become a valuable resource for new products of industrial interest, including antimicrobial, cytotoxic, neurotoxic, antimitotic, antiviral, and anticancer drugs [10]. From extreme conditions, various bioactive metabolites have already been described, such as pyrostatins, salinosporamides, abyssomycins, trioxacarin A, gutingimicin, sporolids, marinomycins, himalamycins, diazepinomycin, helquinoline, lajollamycin, tetrodotoxin, mechercharmucins, cyanrimycins, and others.

The study of the antagonism of extremophilic actinomycetes by various researchers shows a variety of antibacterial properties, both in relation to gram-positive and gram-negative opportunistic pathogens. In the course of research on the discovery of new natural products from extremophilic actinomycetes, new linear polyketides and actinopolysporins A, B, and C were obtained from the halophilic actinomycete *Actinopolyspora erythraea* YIM 90600 [18]. P-terphenyls with antifungal, antibacterial, and antioxidant activity were isolated and characterized from the halophilic actinomycete *Nocardiopsis gilva* YIM 90087 [19]. A new antibiotic, anthracymycin, is described, which is produced by actinomycetes of marine origin in a salt medium [20]. An antimicrobial quinoline alkaloid was isolated from a new halophilic actinomycete *Nocardiopsis terrae* YIM 90022 [21]. Eighteen species of the genus *Streptomyces* were isolated from the saline ecosystems of Nepal, and 12 isolates showed antibacterial activity against extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) produced by *E. coli* [22]. New antibiotics, such as quinicomycin and lajollamycin, have been found in halophilic and halotolerant species of actinomycetes [10]. *Streptomyces* spp. AJ8, isolated from the bottom sediments of salt pans in India, had a strong antagonistic effect against *S. aureus*, *A. hydrophila*, and *C. albicans* [23]. A strain of *Streptomyces* VITSVK5 spp., which forms a biologically active substance from the pyrrolidine group with high activity against *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. fumigatus*, and *A. niger*, was isolated from a salt marsh in southern India [24]. Four isolates of *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flaveous*, *Streptomyces plicatus*, and *Streptomyces griseoruber* isolated from saline and alkaline soils of Egypt showed high antimicrobial antagonistic properties [25].

Our data, as well as literature data, demonstrate the diversity of antibacterial properties of extremophilic actinomycetes from unusual ecosystems of Kazakhstan. Analysis of our data showed that 111 (16.6%) isolates of extremophilic actinomycetes showed antibacterial properties against the studied gram-positive (*S. aureus* № 228) and 14 (2.1%) isolates - against gram-negative (*E. coli* № 603) test-microorganisms. Isolates of extremophilic actinomycetes showed antibacterial activity under extreme growth conditions, which indicates their promise for further research.

Isolates №№ 3/16/1, 1/34/3, 1/37/2, 2/39/3, 1/51/1, 3/67/1, 2/89/2 showed the highest activity under extreme growth conditions against *S. aureus* № 228 (inhibition zone diameter - up to 30,1±0,2 mm), against *E. coli* № 603 - isolates №№ 2/15/2, 3/16/1, 1/37/1, 2/37/4 (diameter of the zone of growth suppression - up to 25,5±0,1 mm).

99 isolates (87.6%) of actinomycetes out of 113 isolates with detected antibacterial activity had a narrow spectrum of antagonistic action against gram-positive test microorganisms (*S. aureus* № 228) and only 2 isolates (1.8%) showed a narrow spectrum of action against gram-negative opportunistic bacteria (*E. coli* № 603). 12 isolates (10.6%) of extremophilic actinomycetes with antibacterial properties had a wide spectrum of antibacterial action and were active simultaneously against gram-positive (*S. aureus* № 228) and gram-negative (*E. coli* № 603) opportunistic pathogens.

11 isolates of actinomycetes showed activity only under extreme growth conditions (when growing both on medium 2 with 3.5% NaCl, pH 7.0 and in alkaline conditions - when growing on medium 3 with 0.35% NaHCO₃, pH 9 ,0): №№ 1/11/5, 3/15/1, 3/16/1, 2/37/4, 2/51/3, 2/55/1, 3/58/3, 2/ 59/1, 1/67/1, 3/67/1, 2/89/2. Isolates № 2/51/3 and 2/89/2 showed high antibacterial activity against gram-positive opportunistic bacteria (*S. aureus* № 228, MRSA) under extreme growth conditions; activity was also most pronounced under alkaline growth conditions - zone diameter growth suppression - 20,5±1,0-30,1±0,2 mm. Isolate № 2/37/4 had a narrow spectrum of action against gram-negative bacteria, the diameter of the zone of inhibition of growth of *E. coli* № 603 on medium 2 was 25,5±0,1 mm. Isolate № 3/16/1 showed a wide spectrum of activity with a high level of activity only under extreme growth conditions: when growing on medium 2 (3.5% NaCl), the growth inhibition zone of *S. aureus* № 228 was 30,4±0,5 mm, *E. coli* № 603 – 25,2±0,6 mm.

18 isolates of actinomycetes showed antibacterial activity when growing in only one extreme medium: №№ 1/11/1, 2/15/1, 2/15/2, 1/15/7, 3/37/1, 1/40 /2, 2/49/2, 1/58/1 - on medium 2; №№ 3/34/1, 3/39/1, 3/50/5, 2/51/1, 2/51/2, 1/73/1, 1/79/1, 1/79/8, 3/79/5, 3/94/2 - on medium 3. Isolate

№ 2/15/2 has a narrow spectrum of action against gram-negative test microorganisms (*E. coli* № 603), activity was detected when growing on medium 2 - diameter zones of growth inhibition - $25,3 \pm 0,7$ mm. High activity against gram-positive bacteria on medium 2 was shown by isolate № 1/15/7 - the diameter of the growth inhibition zone was $20,6 \pm 0,4$ mm (*S. aureus* № 228). Isolate № 3/79/5 showed the highest activity on medium 3 - the diameter of the growth inhibition zone was $25,2 \pm 0,7$ mm (*S. aureus* № 228). Isolate № 2/15/1 showed a wide spectrum of antibacterial action on medium 2, the diameter of the growth inhibition zone for *S. aureus* № 228 – $22,0 \pm 0,5$ mm, *E. coli* № 603 – $23,4 \pm 0,7$ mm.

The obtained results are consistent with literature data regarding the activity of actinomycetes isolated from extreme ecosystems across various regions of the Earth. Actinomycete isolates obtained from saltworks in Jaipur, India, exhibited activity against *S. aureus*, with growth inhibition zones ranging from 15 ± 0.57 to 35 ± 0.88 mm [26]. Actinomycete isolates from saline soils in Morocco also demonstrated activity when grown on Bennett's medium, with growth inhibition zone diameters of 20.3 ± 0.5 mm against *S. aureus* and 13 ± 1 mm against *E. coli* [27]. In another study, 21 isolates obtained from arid soil in South Africa showed activity against *S. aureus*, with inhibition zones ranging from 16 to 40 mm, and against *E. coli* (ToIC) (7 isolates) with inhibition zones of 12-20 mm [28]. Additionally, eight isolates obtained from saline soil in Algeria exhibited antimicrobial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria, with growth inhibition zone diameters ranging from 16 to 45 mm [29].

Conclusion

From the extremal ecosystems of Kazakhstan, we isolated 667 strains of halo-, alkaliphilic, salt- and pH-tolerant extremophilic actinomycetes with the potential to synthesize new natural products for medicine. Among 113 isolates of extremophilic actinomycetes obtained from Northern, Western, and Southern Kazakhstan, we identified antibacterial properties: 111 isolates exhibited activity against the clinical strain of *S. aureus* № 228 (MRSA), and 14 isolates of extremophilic actinomycetes showed activity against the clinical strain of *E. coli* № 603. While most strains of extremophilic actinomycetes displayed a narrow spectrum of antibacterial activity, 12 isolates exhibited a broad spectrum of activity, actively inhibiting both gram-positive (*S. aureus* № 228) and gram-negative (*E. coli* № 603) opportunistic pathogens. We selected these extremophilic actinomycete isolates with antibacterial properties under extreme growth conditions for further research as promising producers of new natural compounds for medical applications.

Funding

The work was supported by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher education of the Republic of Kazakhstan (grant № AP14869253).

References:

- 1 Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. Nat. Prod. Rep. 2017, 34(10):1203–1232 (doi: 10.1039/c7np00026j)
- 2 Fair R.J., Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspect. Med. Chem. 2014, 6:25–64 (doi: 10.4137/PMC.S14459)
- 3 Butler, M. S., Blaskovich, M. A., and Cooper, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. J. Antibiot. 2013, 66, 571–591. (doi: 10.1038/ja.2013.86)
- 4 Demain A.L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. J. Antibiot. 2009, 62:5–16 (doi: 10.1038/ja.2008.16)
- 5 Katz L., Baltz R.H. Natural product discovery: past, present, and future. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2016, 43:155–176 (doi: 10.1007/s10295-015-1723-5)
- 6 Krug D., Muller R. Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products. Nat. Prod. Rep. 2014, 31:768–783 (doi: 10.1039/c3np70127a)
- 7 Walsh C. Where will new antibiotics come from? Nature Rev. Microbiol. 2003, 1:65–70 (doi: 10.1038/nrmicro727)

- 8 Tulp M., Bohlin L. Rediscovery of known natural compounds: nuisance or goldmine? *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13:5274–5282 (doi: 10.1016/j.bmc.2005.05.067)
- 9 Peraud O., Biggs J. S., Huguen R. W., Light A. R., Concepcion G. P., et al. Microhabitats within venomous cone snails contain diverse Actinobacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 2009, 75:6820–6826 (doi: 10.1128/AEM.01238-09)
- 10 Hamedi J., Mohammadipanah F., Ventosa A. Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles.* 2013, 17:1–13 (doi: 10.1007/s00792-012-0493-5)
- 11 Jose P. A., Sivakala K. K., Jebakumar S. R. D. Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces* sp. JAJ06. *Int. J. Microbiol.* 2013:526260. (doi: 10.1155/2013/526260)
- 12 Yuan M., Yu Y., Li H.-R., Dong N., Zhang, X.-H. Phylogenetic diversity and biological activity of actinobacteria isolated from the chukchi shelf marine sediments in the Arctic Ocean. *Mar. Drugs.* 2014, 12:1281–1297 (doi: 10.3390/md12031281)
- 13 Trenožnikova L.P., Bajmahanova G.B., Balgimbaeva A.S., Bajmahanova B.B., Smirnova I.Je., Fajzulina Je.R., Spankulova G.A., Tatarkina L.G., Mombekova G.A., Elubaeva A.E., Ajtkel'dieva S.A., Tleubekova D.A. Biotehnologičeskij potencial jekstremofil'nyh aktinomicetov dlja mediciny i strategii ego otkrytija. *Mikrobiologija zhəne virusologija.* 2021, 4(35):4–26. (<https://doi.org/10.53729/MVAS.2021.04.01>)
- 14 Baltz R.H. Gifted microbes for genome mining and natural product discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 44:573–588 (doi: 10.1007/s10295-016-1815-x)
- 15 Aigle B., Lautru S., Spitteller D., Dickschat J.S., Challis G.L., Leblond P., Pernodet J.L. Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 41:251–263 (doi: 10.1007/s10295-013-1379-y)
- 16 Trenožnikova L., Azizan A. Discovery of Actinomycetes from Extreme Environments with Potential to Produce Novel Antibiotics. *Cent. Asian J. Glob. Health.* 2018, 7(1):337 (doi: 10.5195/CAJGH.2018.337)
- 17 Borovikov V.P. A popular introduction to modern data analysis in the STATISTICA system. Moscow: Hotline-Telecom. 2016; 288 p.
- 18 Zhao L.X., Huang S.X., Tang S.K., Jiang C.L., Duan Y., Beutler J.A., et al. Actinopolysporins A–C and Tubercidin as a Pcd4 stabilizer from the halophilic actinomycete *Actinopolyspora erythraea* YIM 90600. *Nat. Prod.* 2011, 74(9):1990–1995 (doi: 10.1021/np200603g)
- 19 Tian S.Z., Pu X., Luo G., Zhao L.X., Xu L.H., Li W.J., et al. Isolation and characterization of new p-Terphenyls with antifungal, antibacterial, and antioxidant activities from halophilic actinomycete *Nocardiopsis gilva* YIM 90087. *J. Agr. Food Chem.* 2013, 61(12):3006–3012 (doi: 10.1021/jf400718w)
- 20 Jang K.H., Nam S.J., Locke J.B., Kauffman C.A., Beatty D.S., Paul L.A., et al. Anthracimycin, a potent Anthrax antibiotic from a marine-derived actinomycete. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013, 52(30):7822–7824 (doi: 10.1002/anie.201302749)
- 21 Tian S., Yang Y., Liu K., Xiong Z., Xu L., Zhao L. Antimicrobial metabolites from a novel halophilic actinomycete *Nocardiopsis terrae* YIM 90022. *Nat. Prod. Res.* 2014, 28(5):344–346 (doi: 10.1080/14786419.2013.858341)
- 22 Khadayat K., Sherpa D.D., Malla K.P., Shrestha S., Rana N., Marasini B.P., Khanal S., Rayamajhee B., Bhattarai B.R., Parajuli N. Molecular Identification and Antimicrobial Potential of *Streptomyces* Species from Nepalese Soil. *Int. J. Microbiol.* 2020:8817467 (doi: 10.1155/2020/8817467)
- 23 Jenifer J.S.C.A., Donio M.B.S., Michaelbabu M., et al. Haloalkaliphilic *Streptomyces* spp. AJ8 isolated from solar salt works and its' pharmacological potential. *AMB Expr.* 2015, 5(1):143 (doi: 10.1186/s13568-015-0143-2)
- 24 Saurav K., Kannabiran K. In vitro activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. against fungal and bacterial human pathogens. *Revista Iberoamericana de Micología.* 2012, 29(1):29–33 (doi: 10.1016/j.riam.2011.06.008)
- 25 Hozzein W.N., Ali M.I., Ahmad M.S. Antimicrobial activities of some alkaliphilic and alkaline-resistant microorganisms isolated from Wadi Araba, the eastern desert of Egypt. *J. Life Sci.* 2013, 10(4):1823–1828 (<https://www.researchgate.net/publication/288289450>)
- 26 Jose P.A., Jebakumar S.R. Phylogenetic appraisal of antagonistic, slow growing actinomycetes isolated from hypersaline inland solar salterns at Sambhar salt Lake, India. *Front. Microbiol.* 2013, 10:4:190 (doi: 10.3389/fmicb.2013.00190)

27 El Karkouri A., Assou S.A., El Hassouni M. Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from an extreme Moroccan biotope. *Pan Afr. Med. J.* 2019, 29;33:329 (doi: 10.11604/pamj.2019.33.329.19018)

28 Charousová I., Medo J., Hleba L., Císarová M., Javoreková S. Antimicrobial activity of actinomycetes and characterization of actinomycin-producing strain KRG-1 isolated from Karoo, South Africa. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2019, 55. (doi: 10.1590/s2175-97902019000217249)

29 Belkacem I., Hakim D., Ramzi S. Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Saline Soil Samples with Antimicrobial Activities against Microbial Pathogens. *South Asia J. of Experimental Biology.* 2023, 13(2):114-124 (doi: [https://doi.org/10.38150/sajeb.13\(2\).p114-124](https://doi.org/10.38150/sajeb.13(2).p114-124))