МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 6, с. 718–727

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ШТАММ AZ-130 ИЗ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ АЗЕРБАЙДЖАНА: ИЗОЛЯЦИЯ, АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2021 г.
А. Г. Агаева[a, b, *], С. Дж. Стритфилд[a], И. М. Гусейнова[b]

[a]*Фраунхофер США, Центр Средней Атлантики, Ньюарк, DE 19711 Соединенные Штаты Америки*

[b]*Институт молекулярной биологии и биотехнологий НАН Азербайджана, Баку, AZ1073 Азербайджан*

**e-mail: aytanaghayeva@gmail.com*

Поступила в редакцию 14.04.2021 г.
После доработки 21.07.2021 г.
Принята к публикации 30.07.2021 г.

Целью представленной работы является изоляция бактерий из нефтезагрязненных почв Азербайджана, их антибактериальный скрининг и выбор оптимальных условий для максимальной продукции веществ, обладающих антибактериальной активностью, так как исследование необычных и ранее не анализированных источников представляет значительный интерес для выделения штаммов бактерий с новыми свойствами. В результате проведенных исследований из нефтезагрязненного образца почвы, собранного в поселке Лёкбатан, были выделены 44 бактериальных штамма, которые анализировались на наличие антибактериальной активности против одного грамотрицательного и двух грамположительных условно-патогенных штаммов методом подавления роста. После первичного скрининга установлено, что 3 штамма продуцировали соединения, обладающие антибактериальной активностью, по меньшей мере, против одного индикаторного организма. При скрининге супернатанта штамм AZ-130 показал сильную антиграмположительную активность и методом секвенирования гена 16S рРНК был идентифицирован как *Bacillus vallismortis*. Поиск в APD3 показал, что на данный момент нет известных антибиотиков, продуцируемых бактерий *B. vallismortis*. Для дальнейшей очистки и характеристики антимикробного соединения, продуцируемого данным штаммом, условия выращивания (среда, температура и время культивирования), при которых синтез антимикробного соединения достигает наивысших значений, были оптимизированы. Исследовано влияние компонентов четырех сред при четырех различных температурах на продукцию биоактивной молекулы AZ-130. Супернатанты, собранные от культур AZ-130, выращенных при соответствующих условиях, очищали и анализировали на антибактериальную активность против *Staphylococcus aureus* методом подавления роста и микроразведения в бульоне. Продукция молекулы AZ-130 достигает наивысшего уровня при культивировании штамма в среде ТВ + 2% глюкоза в течение 2 сут при температуре 32°C.

Ключевые слова: антибактериальные агенты, антимикробная активность, антибиотики, биоактивные молекулы, вторичный метаболит, натуральные продукты, оптимизация среды, патогенные бактерии, первичный метаболит, условия культивирования

DOI: 10.31857/S0026365621060033

Антибиотики, являясь очень важными натуральными продуктами для здоровья человека, внесли значительный вклад в борьбу с инфекционными заболеваниями (Li, Vederas, 2009; Newman, Cragg, 2012). С 1928 года, когда А. Флемингом был открыт пенициллин, антибиотики стали основным средством борьбы с такими патогенными микроорганизмами, как *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и другими (Fleming, 1929; Aminov, 2010). Однако в последние годы многие патогенные бактерии приобретают устойчивость к антибиотикам (метициллин-устойчивый *S. aureus* (MRSA), устойчивый к карбапенемам *A. baumannii* (CRAB), полирезистентный *P. aeruginosa* (MDR) и т.д.), что приводит к тому, что многие коммерчески доступные антибиотики постепенно теряют свою эффективность (Manchanda et al., 2010; Okwu et al., 2019). Стремительное увеличение числа устойчивых к антибиотикам патогенов (Otto, 2013; Prestinaci et al., 2015; Ventola, 2015; van Duin and Paterson, 2016; Johnning et al., 2018) и существующие трудности в процессе разработки новых антибиотиков (Kim 2013; Carrano et al., 2015) становится серьезной угрозой глобальному здоровью. Например, в последнее время увеличивается число грамотрицательных патогенных бактерий, несущих плазмиду с геном New Delhi metallo-beta-

lactamase-1 (NDM-1), который способствует возникновению устойчивости почти ко всем имеющимся на рынке бета-лактамным антибиотикам и быстро распространяется между разными видами бактерий посредством горизонтального переноса генов (Fomda et al., 2014; Khan et al., 2017; Lerminiaux, Cameron, 2019). Антибиотикотерапия инфекций, вызванных бактериями с геном NDM-1, практически невозможна (Raghunath, 2010; Munita, Arias, 2016).

В то время как число устойчивых к антибиотикам штаммов быстро растет, очень мало новых антибиотиков-кандидатов проходит через фармацевтическую разработку (Dadgostar, 2019; Rončević et al., 2019). За последние 20 лет были лицензированы только два новых класса антибактериальных препаратов – линезолид в 2000 г. и даптомицин в 2003 г. (Ali et al., 2018). Следовательно, возникает острая необходимость в поиске и разработке новых безопасных и эффективных антимикробных соединений против бактериальных инфекций. Для разработки новых антибиотиков очень важно идентифицировать новые, ранее некультивированные штаммы-продуценты, так как большинство применяемых в медицине антибиотиков были выделены непосредственно из живых организмов или представляют собой модифицированные соединения, основные структуры которых имеют природное происхождение (Jones et al., 2017; Ali et al., 2018). Одним из важнейших элементов идентификации новых бактериальных штаммов является образец, из которого изолируются бактерии. Известно, что продуцентами 70% коммерчески доступных антибиотиков являются почвенные бактерии, принадлежащие, в основном, к родам *Streptomyces* и *Bacillus* (Smith, 2000; Procópio et al., 2012; Baindara et al., 2013). Вероятной причиной невозможности идентифицировать новые антимикробные соединения может быть тот факт, что большая часть микроорганизмов, населяющих обычные исследуемые образцы почв, почти полностью изучены и идентифицированы. Считается, что новые биоактивные молекулы можно идентифицировать из необычных источников, которые никогда не анализировались. Различные виды бактерий адаптировались и выживали в необычных условиях в течение сотен миллионов лет, формируя специфическую для данных условий микробиоту. Естественно, что бактерии, населяющие такие почвы, также выработали специфические метаболиты и механизмы для защиты от микробов-конкурентов.

Открытие и разработка нового антимикробного соединения, начиная от идентификации цели до утверждения для продажи, – это очень долгий и дорогостоящий процесс (Ekins et al., 2019). Одним из основных шагов в разработке антибиотиков является оптимизация условий культивирования штамма-продуцента для максимального увеличения выхода конечного метаболита. Компоненты среды и их уровни имеют решающее значение для производства вторичных метаболитов; даже небольшие изменения в питательной среде могут повлиять не только на количество целевого метаболита, но и на общий метаболический профиль штамма-продуцента. Поэтому перед началом любого крупномасштабного производства метаболитов необходимо оптимизировать условия роста штамма-продуцента (Wang et al., 2011; Arul Jose et al., 2013; Singh et al., 2017).

Учитывая критическую важность разработки новых антибиотиков, основной целью данной работы является изоляция бактерий из ранее не анализированных образцов, их антибактериальный скрининг и выбор оптимальных условий для максимальной продукции интересующего нас соединения. Для реализации поставленной цели, мы решили изолировать бактерии из нефтезагрязненных почв Азербайджана, которые никогда не были изучены на наличие антимикробной активности. Как известно, из 8660 тыс. га общей территории Азербайджана приблизительно 21 тыс. га приходится на долю нефтезагрязненных почв (Мамедов, Халилов, 2005; Асланов, Сафарли, 2008). Загрязнение почв нефтью отрицательно влияет на окружающую среду, поскольку разливы нефти сохраняются в почве в течение длительного времени (Marinescu et al., 2017), что приводит к изменениям в качестве почвы, растительности и микробном разнообразии (Margesin et al., 2003). Учитывая, что в литературе практически нет информации об антимикробных свойствах бактерий, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана, наши шансы на обнаружение нового штамма с ценными фармацевтическими и промышленными свойствами возрастают.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изоляция бактерий. Объектом исследования служил нефтезагрязненный образец почвы (рис. 1а), собранный с глубины 5–10 см в поселке Лёкбатан Гарадагского района города Баку (AZ1063, Азербайджан). Изоляция бактериальных штаммов была осуществлена методом стандартного серийного разведения во Фраунхоферском Центре Средней Атлантики (США) (Агаева, 2020). Для этого к 1 г образца добавляли 2 мл однократного натрий-фосфатного буфера и тщательно перемешивали на вортексе. Для осаждения почвенных частиц, полученную смесь инкубировали при комнатной температуре 2 ч. По истечении времени инкубации образец подвергался серийному разведению (от 10^{-1} до 10^{-3}) в стерильном однократном натрий-фосфатном буфере. В качестве плотной питательной среды использовали триптический соевый агар (TSA). Для посева бактерий

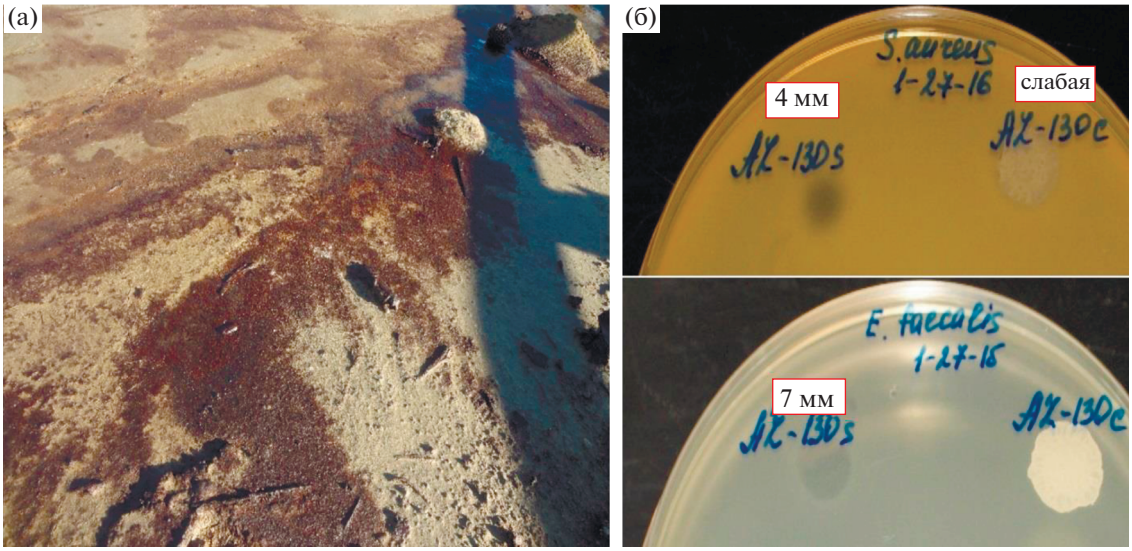

Рис. 1. Место сбора образца нефтезагрязненной почвы, пос. Лёкбатан Гарадагского района города Баку, Азербайджан (а). Результаты антибактериального скрининга (б): штамм AZ-130 показывает слабую активность в культуре (с) против *S. aureus*; активность в культуре против *E. faecalis* отсутствует. Супернатант (s) штамма AZ-130 показывает ~4 мм активность против *S. aureus* и ~7 мм активность против *E. faecalis*.

100 мкл неразбавленного и серийно разбавленных образцов почвенной суспензии наносили на чашки Петри и равномерно распределяли по поверхности питательной среды, используя стерильный шпатель Дригальского. Чашки Петри инкубировали при 32°C в течение 1–7 сут. Бактериальные колонии с разными морфологическими характеристиками, такими как форма колонии, рельеф и характер поверхности, цвет, хромогенез, размер и консистенция, формирующиеся в течение 1–7 сут, переносили на свежую питательную среду, очищали и хранили в 15% глицерине при –80°C. На данной стадии все изолированные штаммы считались неизвестными бактериями и были подвергнуты антибактериальному скринингу.

Антибактериальный скрининг культуры клеток. Первичный скрининг выделенных бактерий на наличие антибактериальной активности проводили методом подавления роста, как описано Хокет (Hockett, Baltrus, 2017) с некоторыми модификациями против трех условно-патогенных индикаторных штаммов: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* и *Escherichia fergusonii*. Штаммы *Enterococcus faecalis* (идентифицирован методом секвенирования гена 16S рРНК как *Enterococcus faecalis* NBRC 100480) и *Escherichia fergusonii* (идентифицирован методом секвенирования гена 16S рРНК как *Escherichia fergusonii* ATCC 35469) были получены во Фраунхоферском Центре Средней Атлантики, США. Для осуществления скрининга к 3 мл мягкого агара (0.8%) добавляли 10 мкл свежеприготовленной суспензии штамма-индикатора (при OD_{600} = 0.5), полученную смесь выливали на чашки Петри с TSA средой и оставляли на несколько минут при комнатной температуре для остывания. В результате получали TSA среду, засеянную штаммом-индикатором. Далее 10 мкл свежеприготовленной суспензии клеток изолированных культур добавляли на чашки Петри с TSA средой, содержащей штамм-индикатор (Balouiri et al., 2016; Hockett, Baltrus, 2017). Чашки инкубировали 20–24 ч при 37°C. Активность определяли по наличию зоны ингибирования (прозрачного кольца) вокруг того места, где была добавлена суспензия. Диапазон антибактериальной активности, или зону подавления роста (ЗПР), выражали в миллиметрах. Для определения ЗПР измеряли толщину прозрачного кольца от края тестируемой колонии до края роста индикаторного штамма. При ЗПР меньше 1 мм активность оценивали как слабую, больше 1 мм – сильную.

Антибактериальный скрининг супернатанта. Для того чтобы определить, секретируют ли активные в культуре бактерии антибактериальное соединение в культуральную жидкость, супернатанты были подвергнуты скринингу. Скрининг по-прежнему осуществляли методом подавления роста (Balouiri et al., 2016; Hockett, Baltrus, 2017). 50 мл жидкой питательной среды TSB (триптический соевый бульон) инокулировали одной колонией активного в культуре штамма и выращивали при 32°C и 180 об./мин в течение 24 ч. По истечении времени инкубации супернатант очищали от клеток сначала центрифугированием при 10000 *g* в течение 15 мин при 4°C культуры, а затем фильтрованием через 0.22 мкм PES-мембрану (мембрану из полиэфирсульфона). Клетки и суперна-

тант культуры исследуемого штамма наносили на чашки Петри с TSA средой, содержащей штамм-индикатор и инкубировали при 37°C в течение 20–24 ч. Диапазон антибактериальной активности, выраженной в миллиметрах, определяли путем измерения диаметра прозрачной зоны (зоны подавления роста индикаторного организма).

Секвенирование гена 16S рРНК и поиск в APD3 на наличие известных антибиотиков. Идентификация штаммов, супернатанты которых показали наибольшую активность, была осуществлена путем секвенирования гена 16S рРНК, для чего штаммы были отправлены в лабораторию Charles Liver (223 Lake Drive, Newark, DE, 19702). После идентификации выбранных изолятов был осуществлен литературный поиск, чтобы узнать какие известные антимикробные молекулы продуцируют изолированные нами штаммы.

Оптимизация состава среды и условий культивирования для максимального производства антибактериального соединения. Для определения оптимального состава среды, температуры и времени наивысшей продукции антибактериального соединения были проанализированы четыре различных типа питательных сред (TSB, TSB с 2% глюкозой, TB, TB с 2% глюкозой) при четырех различных температурах (18, 25, 32, 37°C). Состав триптического соевого бульона (TSB): пептон казеиновый (панкреатический гидролизат) – 17 г/л, пептон соевый (папаиновый гидролизат) – 3 г/л, гидроортофосфат калия (K_2HPO_4) – 2.5 г/л, хлорид натрия – 5 г/л, декстроза (глюкоза) – 2.5 г/л; обезвоженной питательной среды бульона Terrific (TB): триптон (панкреатический гидролизат казеина) – 12 г/л, дрожжевой экстракт – 24 г/л, гидроортофосфат калия (K_2HPO_4) – 9.4 г/л, дигидроортофосфат калия (KH_2PO_4) – 2.2 г/л. Чтобы начальная плотность колоний во всех исследуемых условиях была одинаковой, 10 мл питательной среды были инокулированы одной колонией продуцента и инкубированы при 32°C и 250 об./мин в течение 2 ч (прекультура). Через 2 ч все четыре исследуемые среды (TB +/– глюкоза; TSB +/– глюкоза) инокулировали 1 мл прекультуры и культивировали при соответствующих температурах (18, 25, 32 и 37°C). Через 24, 48 ч и т.д. отбирали 1 мл образца из культуры для анализа. Супернатант очищали от клеточной культуры центрифугированием при 10000 *g* в течение 15 мин при 4°C и фильтрованием через 0.22 мкм PES-мембрану. Вначале все собранные супернатанты были протестированы на ингибирующую активность против *S. aureus* ATCC 29213 методом подавления роста, как описано выше (Hockett, Baltrus, 2017). 10 мкл отобранных образцов супернатантов наносили на чашку с TSA средой, содержащую штамм-индикатор. Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение ночи и измеряли диаметр зоны подавления роста. Затем, для определения условий, в которых концентрация антибактериальных единиц самая высокая, все супернатанты с активностью были проанализированы методом микроразведения в бульоне (Coyle et al., 2005), следуя рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI). 100 мкл супернатанта добавляли в первую ячейку 96-ячеечного планшета и дважды разбавляли вдоль ряда. Затем в каждую ячейку добавляли 50 мкл *S. aureus* ATCC 29213 до конечной концентрации 5×10^4 клеток на ячейку. Для положительного контроля (100% рост индикатора) к 50 мкл среды добавляли 50 мкл индикаторного организма; отрицательным контролем (отсутствие индикатора) служила только питательная среда – 100 мкл. Планшеты закрывали крышкой и инкубировали при 37°C в течение ночи в открытом пакете (для удержания влаги внутри). После инкубации измеряли оптическую плотность при 650 нм с использованием аппарата Molecular Devices Spectra MaxPlus, а затем в каждую ячейку планшета добавляли 10 мкл реагента для определения жизнеспособности клеток PrestoBlue (“Invitrogen”, A13262) и инкубировали планшеты при комнатной температуре в течение 30 мин. Измерение флуоресценции осуществляли при длине волны возбуждения 560 нм и эмиссии 590 нм с использованием флуоресцентного считывателя микропланшетов (Fluorescent microplate reader).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Для того чтобы определить, что антибактериальная активность обусловлена одним действующим компонентом супернатанта, а не несколькими, супернатант, собранный и очищенный из культуры, выращенной в 50 мл TB среды при 32°C в течение ночи, был проанализирован методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. В качестве контроля использовали среда TB. Для ВЭЖХ 100 мкл анализируемого материала загружали в колонку с обращенной фазой C_{18} Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 мм, номер по каталогу 993967-902) с использованием Agilent 1100 HPLC. В качестве подвижных фаз использовали ВЭЖХ H_2O/0.1% TFA (трифторуксусная кислота) (буфер Д) и ацетонитрил/0.1% TFA (буфер Б). Элюцию осуществляли в градиенте 5–95% буфера Б. 24 фракции объемом 1 мл собирали в течении первых 24 мин. Анализ на наличие активности осуществляли методом подавления роста против *S. aureus* ATCC 29213, для чего 10 мкл каждой фракции и загруженного материала наносили на чашку с TSA средой, засеянной штаммом-индикатором.

Сравнительный анализ активности супернатантов различных культур. Для осуществления сравнительного анализа супернатантов 50 мл TB среды инокулировали одной колонией продуцента. Колбы инкубировали в течение 22–24 ч при 32°C

и 220 об./мин. По истечении времени инкубации супернатанты были очищены от клеточной культуры путем центрифугирования при 10000 *g* (30 мин при 4°C) и фильтрования через 0.22 мкм PES-мембрану. Анализ отобранных образцов против *S. aureus* ATCC 29213 и *E. faecalis* осуществляли методом подавления роста, а против самих продуцентов – как методом подавления роста, так и микроразведения в бульоне, методика проведения которых описана выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

44 бактериальных штамма были выделены из нефтезагрязненного образца почвы, собранного в поселке Лёкбатан Гарадагского района города Баку, и проверены на антибактериальную активность против трех условно-патогенных индикаторных организмов методом подавления роста. После первичного скрининга из 44 выделенных культур только 3 обладали активностью (рис. 1б). Культура штамма AZ-130 показала слабую активность против грамположительного штамма *S. aureus* и грамотрицательного *E. fergusonii*, культура штамма AZ-134 показала слабую активность против *E. faecalis*, а культура штамма AZ-195 – слабую антиграмположительную активность против *S. aureus* и *E. faecalis.* Все 3 активные в культуре изолята были проанализированы на наличие активности в бесклеточном культуральном супернатанте. Из трех протестированных штаммов только AZ-130 обладал сильной антиграмположительной активностью в супернатанте против *S. aureus* (ЗПР = 4 мм) и *E. faecalis* (ЗПР = 7 мм) (рис. 1б). Учитывая сильную активность в супернатанте, для дальнейшей характеристики был выбран штамм AZ-130. Описание колонии AZ-130: форма – круглая, профиль – выпуклый, контур края – ровный, поверхность – шероховатая, цвет – бежевый, размер – средний.

На следующем этапе для максимальной продукции антимикробного соединения штаммом AZ-130 были протестированы 16 различных условий культивирования. Собранные по истечении определенного времени супернатанты, очищенные из культур, выращенных в соответствующих условиях, были вначале проанализированы на наличие антибактериальной активности методом подавления роста (табл. 1). Как видно из табл. 1, супернатанты, собранные на 1, 2 и 3 сут из культур, выращенных при 18°C, не обладали никакой активностью. При трех других тестируемых температурах производство антимикробного соединения зависело как от компонентов среды, так и от времени и температуры инкубации. Продукция биоактивной молекулы штаммом AZ-130, выращенным в питательной среде TSB, возрастала по мере увеличения температуры и времени инкубации в течение первых двух суток (ЗПР на 1 сут: при 25°C – отсутствует, при 32°C – 8 мм, при 37°C – 11 мм; ЗПР на 2 сут: при 25°C – 6 мм/неполная, при 32°C – 11 мм и при 37°C – 12 мм) и уменьшалась на 3 или 5 сут (ЗПР при 25°C – отсутствует, при 32°C – 4 мм и при 37°C – 10 мм).

Производство антибактериального соединения AZ-130 штаммом AZ-130, выращенным в среде TB, также колеблется в зависимости от температуры роста и времени инкубации. Слабая активность в супернатанте, наблюдаемая на 1 сут при 25°C, резко возрастала до высокой активности в 11–12 мм при 32 и 37°C. Такая же тенденция к увеличению активности в супернатантах наблюдалась на 2 сут (ЗПР при 25°C – 9 мм, при 32°C – 11 мм, при 37°C – 11 мм). Активность AZ-130 в супернатанте частично уменьшалась на 3 или 5 сут (ЗПР при 25°C – слабая, при 32°C – 7 мм, при 37°C – 5 мм/неполная).

Штамм AZ-130, выращенный в питательной среде TSB + 2% глюкоза, не продуцировал достаточное количество соединения на 1 сут. Однако на 2 сут концентрация антибактериального соединения увеличивалась по мере повышения температуры (ЗПР при 25°C – отсутствует, при 32°C – слабая, при 37°C – 11 мм) и снова уменьшалась на 3 или 5 сут (ЗПР при 25°C – отсутствует, при 32°C – отсутствует и при 37°C – 7 мм).

Что касается среды TB + 2% глюкоза, то при культивировании на ней штамм AZ-130 продуцировал антимикробное соединение при 32 и 37°C. Активность AZ-130, культивированной в данной среде при 32°C, увеличивалась с 4 мм на 1 сут до 8 мм на 2 сут и незначительно снижалась до 7 мм на 5 сут. Аналогичная тенденция в активности AZ-130 наблюдалась при температуре культивировании 37°C (ЗПР на 1 сут – 10 мм, на 2 сут – 12 мм и на 5 сут – 10 мм).

Подводя итог результатов анализа методом подавления роста, можно сделать вывод, что штамм AZ-130 производит наибольшее количество антимикробного соединения при культивировании при 32 и 37°C. Мы не обнаружили какую-либо активность в супернатантах культур AZ-130, выращенных при 18°C. Некоторая активность наблюдалась в супернатантах из культур AZ-130, выращенных при 25°C, но эта активность не была настолько выраженной, как в супернатантах из культур, выращенных при 32 и 37°C.

На следующем этапе, чтобы сравнить концентрацию антибактериальных единиц в активных супернатантах из культур, выращенных при 32 и 37°C, они были проанализированы методом микроразбавления в бульоне (табл. 2).

Наибольшая продукция соединения AZ-130 штаммом AZ-130, выращенным при 32°C, в трех из четырех протестированных сред наблюдалась на 2 сут. Супернатант, собранный из TSB + 2% глюкоза активен после 8-кратного, из TSB – по-

Таблица 1. Суммарная таблица активности собранных супернатантов (СН) штамма AZ-130 против *S. aureus* ATCC 29213, проанализированных методом подавления роста

Температура	Среда	Зона подавления роста (ЗПР), мм		
		СН, 1 сут	СН, 2 сут	СН, 3 сут/5 сут
18°C	TSB	–	–	–
	TB	–	–	–
	TSB + 2% глюкоза	–	–	–
	TB + 2% глюкоза	–	–	–
25°C	TSB	–	6/неполн.	–
	TB	Сл.	9	Сл.
	TSB + 2% глюкоза	–	–	–
	TB + 2% глюкоза	–	–	–
32°C	TSB	8	11	4
	TB	12	11	7
	TSB + 2% глюкоза	–	Сл.	–
	TB + 2% глюкоза	4	8	7
37°C	TSB	11	12	10
	TB	11	11	5 /неполн.
	TSB + 2% глюкоза	–	11	7
	TB + 2% глюкоза	10	12	10

Примечание. “–” – отсутствие активности; СН – супернатант; сл. – слабая активность; неполн. – неполное ингибирование.

Таблица 2. Суммарная таблица активности собранных супернатантов штамма AZ-130 против *S. aureus* ATCC 29213, проанализированных методом микроразведения в бульоне

Температура	Среда	Супернатант активен при разбавлении		
		СН, 1 сут	СН, 2 сут	СН, 5 сут
32°C	TSB	8	16	8
	TB	16	8	8
	TSB + 2% глюкоза	Неразб.	8	4
	TB + 2% глюкоза	16	**32**	16
37°C	TSB	8	16	8
	TB	8	16	8
	TSB + 2% глюкоза	Неразб.	8	8
	TB + 2% глюкоза	16	16	16

Примечание. СН – супернатант; неразб. – неразбавленный.

сле 16-кратного и из TB + 2% глюкоза – после 32-кратного разведения. Супернатант, собранный из TB среды, показывает свою максимальную активность в 16-кратного разведения на 1 сут.

Как видно из результатов анализа супернатантов из тестируемых сред при 37°C, активность разведенного в 16 раз супернатанта, полученного из среды TB + 2% глюкоза, стабильна даже после 5 сут инкубации. Супернатанты AZ-130, собранные из сред TB и TSB при 37°C, показали максимальную 16-кратную активность на 2 сут; супернатанты, собранные из TSB + 2% глюкозы, показали максимальную 8-кратную активность на 2 и 5 сут.

Супернатанты, анализированные методом микроразведения в бульоне, также были проана-

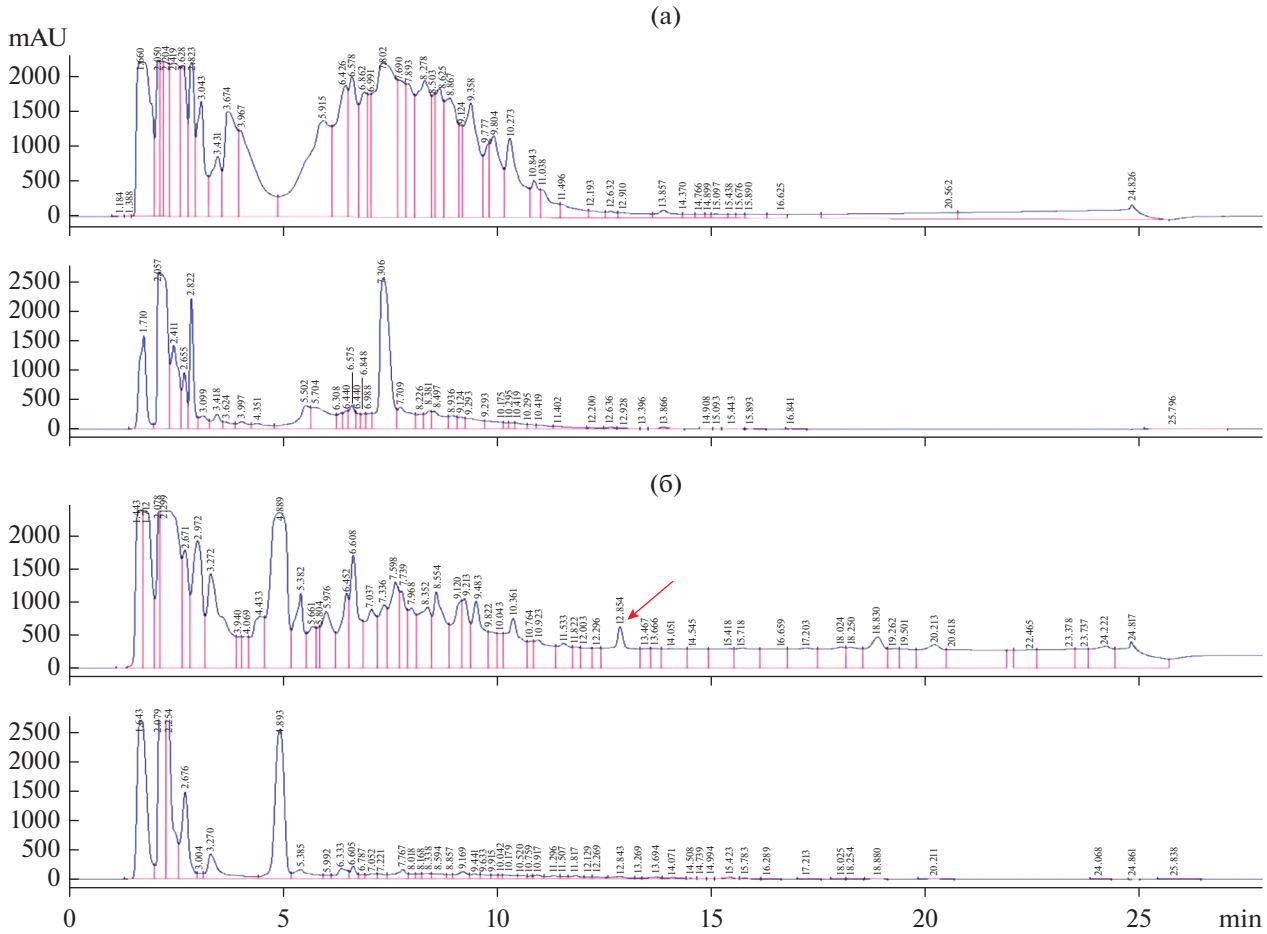

Рис. 2. C_{18} ВЭЖХ хроматограммы ТВ среды (а) и супернатанта AZ-130 (б).

лизированы на жизнеспособность клеток штамма-индикатора путем добавления ко всем ячейкам 96-ячеечного планшета реагента PrestoBlue. Визуальное подтверждение наличия живых клеток штамма-индикатора определяли по изменению цвета в ячейке. Синий цвет означал отсутствие живых клеток, то есть полное ингибирование, а розовый – наличие живых клеток условно-патогенного штамма. После добавления PrestoBlue, достоверность всех полученных выше результатов подтвердили результаты измерения флуоресценции в ячейках при возбуждении 560 нм и эмиссии 590 нм. Полученные результаты полностью подтвердили измерения оптической плотности.

Согласно полученным результатам, максимальная продукция биоактивного соединения AZ-130 наблюдалась при культивировании штамма-продуцента в питательной среде ТВ + 2% глюкоза при 32°C в течение 2 сут. Число ингибирующих единиц в супернатанте из этой среды было, как минимум, в два раза выше по сравнению со всеми другими исследуемыми условиями. Наблюдаемая активность высокая и стабильная, поскольку биомолекула AZ-130 не теряет активности даже после 5 сут инкубации.

На следующем этапе, для того чтобы определить количество антибактериальных компонентов в супернатанте штамма AZ-130, супернатант и ТВ среда были проанализированы методом C_{18} ВЭЖХ (рис. 2).

В процессе ВЭЖХ, начиная с момента инъекции материала, фракции объемом 1 мл были собраны и проанализированы на наличие активности против *S. aureus* ATCC 29213. Пик в хроматограмме со временем удерживания 12.854 мин соответствует фракции 13, продолжение этого пика также наблюдается во фракции 14. Судя по хроматограмме, концентрация соединения во фракции 14 должна быть меньше, что и подтверждают результаты анализа собранных фракций методом подавления роста. Загруженный в колонку супернатант обладал активностью равной 14 мм, фракция 13 и 14 – слабая и очень слабая соответственно. Если сравнить хроматограммы (рис. 2) супернатанта AZ-130 и контроля, а также учитывая результаты

Таблица 3. Суммарная таблица активностей супернатантов, собранных из культур AZ-130 и *B. subtilis*

Штамм	Супернатант *B. vallismortis* AZ-130		Супернатант *B. subtilis*	
	ЗПР, мм	активное разведение	ЗПР, мм	активное разведение
S. aureus ATCC 29213	7	Н/а	Сл.	Н/а
E. faecalis	10	Н/а	7	Н/а
B. vallismortis AZ-130	–	–	9	8
B. subtilis	–	–	–	–

Примечание. "–" – отсутствие активности; сл. – слабая активность; н/а – не анализировали.

антибактериального скрининга, пик со временем удерживания 12.854 мин соответствует активной биомолекуле, продуцируемой штаммом AZ-130. Отсутствие активности во всех остальных фракциях свидетельствует о том, что штамм AZ-130 продуцирует одно соединение с антибактериальной активностью (*Rt* 12.854 мин). Как видно из результатов, высокая активность, наблюдаемая в супернатанте, ослабевает в собранных фракциях, что непосредственно связано с объемами анализируемых материалов. Так, объем загруженного в колонку супернатанта был 100 мкл, а общий объем активных фракций 13 и 14 – 2 мл, что означает, что активность разбавляется приблизительно в 20 раз.

Штамм AZ-130, обладающий сильной и стабильной активностью в супернатанте, путем секвенирования гена 16S рРНК был идентифицирован как *Bacillus vallismortis*. Поиск в APD3 показал, что на данный момент нет известных антибиотиков, продуцируемых бактерией *B. vallismortis*. С другой стороны, *B. vallismortis* очень схожа с *B. subtilis,* которая является продуцентом ряда антибактериальных соединений (Sumi et al., 2015; Caulier et al., 2019). Для выявления сходств и различий в механизмах активности антибактериальных соединений штаммов AZ-130 и *B. subtilis* был осуществлен сравнительный анализ супернатантов этих культур. Штамм *B. subtilis* был получен во Фраунхоферском Центре Средней Атлантики, США и идентифицирован методом секвенирования гена 16S рРНК как *Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii* str. NBRC 101239. Результаты анализа супернатантов из культур AZ-130 и *B. subtilis* методом подавления роста против штаммов *S. aureus* ATCC 29213 и *E. faecalis* (табл. 3), показывают, что штаммы AZ-130 и *B. subtilis* обладают высокой антиграмположительной активностью в супернатанте. Однако, учитывая, что условия инокуляции и роста обеих штаммов являлись одинаковыми, активность супернатанта AZ-130 (против *S. aureus* ATCC 29213 – 7 мм, *E. faecalis* – 10 мм) значительно выше по сравнению с *B. subtilis* (*S. aureus* ATCC 29213 – слабая, *E. faecalis* – 7 мм).

Собранные супернатанты были также проанализированы на ингибирующую активность против самих штаммов и друг против друга (табл. 3). Как выяснилось, супернатант *B. subtilis* показал активность в 9 мм против штамма AZ-130, в то время как супернатант AZ-130 не обладал активностью против штамма *B. subtilis.* Анализ супернатантов методом микроразведения в бульоне подтвердил результаты, полученные методом подавления роста: супернатант *B. subtilis*, даже при 8-кратном разбавлении, полностью ингибирует рост штамма AZ-130, однако в супернатанте AZ-130 не отмечено никакой активности против штамма *B. subtilis*. Учитывая, что продуценты обладают устойчивостью к антимикробным соединениям, которые они продуцируют, подавление роста штамма AZ-130 супернатантом *B. subtilis* указывает на возможные различия в структуре и механизмах действия антибактериальных веществ, секретируемых штаммами AZ-130 и *B. subtilis.*

Количество выделенных бактерий, отличающихся друг от друга морфологическими характеристиками, свидетельствует о целесообразности поиска новых штаммов с полезными свойствами в загрязненных нефтью почвах Азербайджана. Судя по нашим результатам, этот тип почвы может служить источником бактерий, продуцирующих антимикробные препараты. Штамм AZ-130, идентифицированный как *Bacillus vallismortis*, продуцирует антимикробное соединение AZ-130, которое обладает сильной антиграмположительной активностью. Механизм активности антимикробного соединения, продуцируемого штаммом AZ-130, отличается от антибактериальных соединений, секретируемых штаммом *B. subtilis*. Полученные результаты подтверждают важность оптимизации даже самых незначительных параметров при культивировании микроорганизмов. Компоненты питательной среды, температура и время инкубации играют важную роль в продукции биомолекулы AZ-130 бактериальным штаммом AZ-130.

БЛАГОДАРНОСТИ

Представленная работа является частью докторской диссертации, которая будет представлена в Институт молекулярной биологии и биотехнологий НАН Азербайджана. Авторы статьи выражает благодарность

и глубокую признательность профессору С. Годьдману (“Evolva”, Калифорния, США) и Ч.М. Моррису (“Hygiena/Qualicon Diagnostics LLC”, Делавер, США) за советы и ценные замечания при работе над данной статьей.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли свой вклад в концепцию и дизайн исследования. Идея была предложена академиком Ирадой Гусейновой. Первый автор подготовил материал, собрал и проанализировал данные под руководством второго и третьего авторов и написал первый вариант рукописи. Все авторы рассмотрели первоначальные версии рукописи и одобрили окончательную рукопись. Рукопись не отправлялась в другой журнал. Это оригинальная работа авторов. Представленные результаты одобрены к публикации ответственным органом институтов, в которых выполнялась работа.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Агаева А.Г. Создание бактериальной коллекции на основе штаммов, изолированных из почв Азербайджана и их скрининг на наличие новых антибактериальных биомолекул // Журн. Наук о Жизни и Биомедицины. 2019. Т. 1(74). № 2. С. 13–19.

Асланов Г.К., Сафарли С.А. Нефтезагрязненные земли Азербайджана, их рекультивация и освоение. Баку: Наука, 2008. 191 с.

Мамедов Г.Ш., Халилов М.Ю. Экология и охрана окружающей среды. Баку: Наука, 2005. 880 с.

Ali S.M., Siddiqui R., Khan N.A. Antimicrobial discovery from natural and unusual sources // J. Pharm. Pharmacol. 2018. V. 70. P. 1287–1300.

Aminov R.I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future // Front. Microbiol. 2010. V. 1. Art. 134.

Arul Jose P., Sivakala K.K., Jebakumar S.R. Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces* sp. JAJ06 // Int. J. Microbiol. 2013. Art. ID 526260.

Baindara P., Mandal S.M., Chawla N., Singh P.K., Pinnaka A.K., Korpole S. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample // AMB Express. 2013. V. 3. 2.

Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review // J. Pharm. Anal. 2016. V. 6. P. 71–79.

Carrano L., Marinelli F. The relevance of chemical dereplication in microbial natural product screening // J. Appl. Bioanal. 2015. V. 1. P. 55–67.

Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C., Mahillon J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 302.

Coyle M.B., Coord. Ed. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. American Society for Microbiology, 2005.

Dadgostar P. Antimicrobial resistance: Implications and costs // Infect. Drug Resist. 2019. V. 12. P. 3903–3910.

Ekins S., Puhl A.C., Zorn K.M., Lane T.R., Russo D.P., Klein J.J., Hickey A.J., Clark A.M. Exploiting machine learning for end-to-end drug discovery and development // Nature Mater. 2019. V. 18. P. 435–441.

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza* // Br. J. Exp. Pathol. 1929. V. 10. P. 226–236.

Fomda B.A., Khan A., Zahoor D. NDM-1 (New Delhi metallo beta lactamase-1) producing Gram-negative bacilli: Emergence & clinical implications // Indian J. Med. Res. 2014. V. 140. P. 672–678.

Hockett K.L., Baltrus D.A. Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds // J. Vis. Exp. 2017. V. 119. Art. 55064.

Johnning A., Karami N., Hallbäck T.E., Müller V., Nyberg L., Buongermino P.M., Stewart C., Ambjörnsson T., Westerlund F., Adlerberth I., Kristiansson E. The resistomes of six carbapenem-resistant pathogens – a critical genotype–phenotype analysis // Microbial Genomics. 2018. V. 4. Art. e000233.

Jones M.B., Nierman W.C., Shan Y., Frank B.C., Spoering A., Ling L., Peoples A., Zullo A., Lewis K., Nelson K.E. Reducing the bottleneck in discovery of novel antibiotics // Microbial Ecol. 2017. V. 73. P. 658–667.

Khan A.U., Maryam L., Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM): a threat to public health // BMC Microbiol. 2017. V. 17. 101.
https://doi.org/10.1186/s12866-017-1012-8

Lerminiaux N.A., Cameron A.D.S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments // Can. J. Microbiol. 2019. V. 65. P. 34–44.

Lewis K. Platforms for antibiotic discovery // Nature Reviews. Drug Discovery. 2013. V. 12. P. 371–387.

Li J.W.H., Vederas J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? // Science. 2009. V. 325. P. 161–165.

Manchanda V., Sanchaita S., Singh N.P. Multidrug resistant *Acinetobacter* // J. Glob. Infect. Dis. 2010. V. 2. P. 291–304.

Margesin R., Labbe D., Schinner F., Greer C., Whyte L. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 3085–3092.

Marinescu M., Lacatusu A., Gament E., Plopeanu G., Carabulea V. Bioremediation potential of native hydrocarbons degrading bacteria in crude oil polluted soil // Bulletin USAMV. Ser. Agriculture. 2017. V. 74.
https://doi.org/10.15835/buasvmcn-agr:12654

Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of antibiotic resistance // Microbiol. Spectr. 2016. V. 4. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015

Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010 // J. Nat. Prod. 2012. V. 75. P. 311–335.

Okwu M.U., Olley M., Akpoka A.O., Izevbuwa O.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review // AIMS Microbiol. 2019. V. 5. P. 117–137.

Otto M. Community-associated MRSA: what makes them special? // Int. J. Med. Microbiol. 2013. V. 303. P. 324–330.

Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon // Pathog. Glob. Health. 2015. V. 109. P. 309–318.

Procópio R.E., Silva I.R., Martins M.K., Azevedo J.L., Araújo J.M. Antibiotics produced by *Streptomyces* // Braz. J. Infect. Dis. 2012. V. 16. P. 466–471.

Raghunath D. New metallo β-lactamase NDM-1 // Indian J. Med. Res. 2010. V. 132. P. 478–481.

Rončević T., Puizina J., Tossi A. Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. Art. 5713.

Singh V., Haque S., Niwas R., Srivastava A., Pasupuleti M., Tripathi C.K. Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review // Front. Microbiol. 2017. V. 7. Art. 2087.

Smith T. Antibiotics from soil bacteria // Nat. Struct. Biol. 2000. V. 7. P. 189–190.

van Duin D., Paterson D.L. Multidrug resistant bacteria in the community: Trends and lessons learned // Infect. Dis. Clin. North. Am. 2016. V. 30. P. 377–390.

Sumi C.D., Yang B.W., Yeo I.C., Hahm Y.T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics // Can. J. Microbiol. 2015. V. 61. P. 93–103.

Ventola C.L. The antibiotic resistance crisis. Part 1: Causes and threats // Pharmacy and Therapeutics. 2015. V. 40. P. 277–283.

Wang Y., Fang X., An F., Wang G., Zhang X. Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology // Microb. Cell Fact. 2011. V. 14. Art. 98. https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-98

Strain AZ-130 from Oil-Contaminated Soil of Azerbaijan: Isolation, Antibacterial Screening, and Optimization of Cultivation Conditions

A. G. Aghayeva[1, 2, *], S. J. Streatfield[1], and I. M. Huseynova[2]

[1]*Fraunhofer USA, Inc.,Newark, DE 19711 United States*

[2]*Institute of Molecular Biology and Biotechnologies, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, AZ1073 Azerbaijan*

**e-mail: aytanaghayeva@gmail.com*

Received April 14, 2021; revised July 21, 2021; accepted July 30, 2021

Abstract—The goal of the presented work was to isolate bacteria from oil-contaminated soils of Azerbaijan, screen them for their antibacterial activity, and determine the optimal conditions for production of the antibacterial compounds of interest, since unusual and previously unanalyzed sources are of significant interest for the isolation of bacterial strains with novel properties. This work resulted in isolation of 44 bacterial strains from an oil-contaminated soil sample collected in the Lokbatan settlement, which were analyzed for the presence of antibacterial activity against two gram-positive and one gram-negative opportunistic pathogenic strains using the growth inhibition assay. After initial screening, 3 strains showed an antibacterial activity against at least one test organism. Supernatant screening of strain AZ-130 revealed its strong anti-gram-positive activity. The isolate was identified as a *Bacillus vallismortis* strain (99%) by 16S rRNA gene sequencing. A search in APD3 showed that currently there are no known antibiotics produced by *B. vallismortis*. To further purify and characterize the antimicrobial compound produced by this strain, the growth conditions (medium, incubation temperature, and cultivation time) at which production of the antimicrobial compound reached the highest values were optimized. The effect of the components of four media at four different temperatures on the production of the AZ-130 bioactive molecule was investigated. The supernatants collected from AZ-130 cultures grown under appropriate conditions were purified and assayed for antibacterial activity against *S. aureus* by the growth inhibition and broth microdilution methods. Production of the AZ-130 molecule reached its highest level when the strain was cultivated in a TB + 2% glucose medium for 2 days at a temperature of 32°C

Keywords: antibacterial agents, antimicrobial activity, antibiotics, bioactive molecules, secondary metabolite, natural products, media optimization, pathogenic bacteria, primary metabolite, cultivation conditions