

УДК 615.779.9

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СОЕДИНЕНИЙ С АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ НОВОГО ПОЧВЕННОГО ИЗОЛЯТА *Streptomyces rimosus* МТСС 10792

© 2013 г. Н. Сингх*, В. Рай*, С. Трипати**

*Лаборатория биохимии и микробиологии школы естественных наук университета г. Шукла, Райпур,
Пт. Равишанкар 492010, Индия

**Кафедра технологии ферментации Центрального научно-исследовательского института лекарств,
Лакхнау, 226 001, Индия
e-mail: nevi0007@gmail.com

Поступила в редакцию 29.10.2012 г.

Идентифицирован новый штамм *Streptomyces* sp., выделенный из почвы штата Чхаттисгарх (Индия), имеющий широкий спектр антибактериальной и противогрибковой активности. На основании исследования физиолого-биохимических свойств и последовательности 16S рРНК выделенный активный штамм был отнесен к *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* (10792 МТСС). Антимикробная активность соединений, выделенных из *S. rimosus*, изучена по отношению к резистентным к антибиотикам патогенным бактериям по методу Бауэра и Кирби. Активные метаболиты экстрагировали из культуральной жидкости *n*-бутанолом и проводили очистку методом хроматографии на силикагеле и ВЭЖХ. Охарактеризованы физико-химические свойства одного из выделенных соединений: цвет, температура плавления, растворимость, исследован элементный анализ, проведены химические реакции, на наличие химических групп, проанализированы данные масс-спектрометрии (ESI-МС), ИК- и, УФ-спектроскопии, ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР. Очищенное противомикробное соединение, синтезируемое *S. rimosus* МТСС 10792, в концентрации 25 мкг/мл обладало противотуберкулезной активностью по отношению к *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* H37R, а также антимикробной активностью в отношении всех протестированных бактериальных и грибных патогенов.

DOI: 10.7868/S0555109913050115

Резистентность большого количества патогенных бактерий и грибов к биологически активным вторичным метаболитам, используемым в качестве лекарственных средств, ставит перед исследователями задачи поиска новых противогрибковых и антибактериальных веществ, необходимых для борьбы с этими патогенами. Нитчатые почвенные бактерии, принадлежащие к роду *Streptomyces*, продуцируют большое количество естественных продуктов, обладающих биологической активностью, широко применяемых в качестве лекарственных средств и агрохимикатов. Из этих бактерий получают около 75% коммерческих и терапевтически важных антибиотиков [1]. При отборе культур с антимикробной активностью из образцов почвы, собранных в центральном штате Индии Чхаттисгарх, был выделен штамм *Streptomyces rimosus*. Этот штамм широко известен тем, что именно он секретирует окситетрациклин и другие антибиотики, производные тетрациклина. В 1950 г. А.С. Финлей и корпорация “Пфайзер” объявили об открытии аналогичного антибиотика, полученного также из *S. rimosus*, который был назван тетрациклин (переименован в окситетрациклин позднее) [2]. Окситетрациклин и его про-

изводные являются антибиотиками широкого спектра действия, ингибируют синтез белка у бактерий путем связывания с 30S-субъединицей рибосом. Производные окситетрациклина образуются с помощью хорошо развитой генетической системы *S. rimosus* [3, 4]. Кроме окситетрациклина были обнаружены новые соединения – стрептопирролы, полученные из *S. rimosus* с белком гистидинкиназой, которые обладали антимикробной активностью [5]. О выделении и очистке противогрибковых соединений из *S. rimosus* MY02 сообщалось в работе [6]. Исследование природных изолятов может дать большой материал для обнаружения и синтеза новых химических соединений, поэтому исследователи направляют свое внимание на изучение необычных и ранее не исследованных экосистем, для выявления новых фармацевтических объектов [7, 8].

Цель работы – выделение и исследование химических свойств антимикробных соединений, продуцируемых новыми изолятами *S. rimosus* МТСС 10792.

МЕТОДИКА

Организм-продуцент. Биологически активный изолят, названный Y8, был выделен из образцов почвы в заповеднике штата Чхаттисгарх (Индия). Культуру выделенного изолята поддерживали в пробирках на скошенной агаризованной среде ISP-2, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт – 4.0, солодовый экстракт – 10.0, глюкоза – 4.0, CaCO₃ – 2.0 и агар – 20.0. Морфологические и физиологические свойства штамма были изучены в рамках международного проекта *Streptomyces* (ISP) [9]. Культура таксономически определена на основании гомологии 16S рРНК и сравнения с микробной коллекцией типовых культур (МТСС), Чандигарх, Индия, и отнесена к *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* МТСС 10792.

Штаммы тест-культур, использованные для оценки антимикробной активности. Для выявления антимикробной активности исследуемого соединения *S. rimosus* МТСС 10792 были использованы следующие микроорганизмы: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra, *Bacillus subtilis* (МТСС 1789), *Bacillus pumilus* (МТСС 1607), *Bacillus megaterium* (МТСС 1684), *Bacillus cereus* (МТСС 1305), *B. cereus* (АТСС 10876), *Staphylococcus aureus* (МТСС 96), *S. aureus* (МТСС 737), *Staphylococcus epidermidis* (МТСС 435), *Salmonella typhi* (МТСС 531), *Proteus vulgaris* (МТСС 1771), *Klebsiella pneumoniae* (МТСС 2405), *Escherichia coli* (МТСС 1667), *E. coli* (МТСС 739), *E. coli* (МТСС 1687), *E. coli* (АТСС 35218) *Candida albicans* (МТСС 1637), *C. albicans* (МТСС 184), *C. albicans* (МТСС 183), *Candida tropicalis* (МТСС 3017), *Aspergillus niger* (МТСС 872), *Aspergillus fumigatus* (МТСС 2544), *Alternaria alternata* (МТСС 1779), *Penicillium citrinum* (МТСС 1751), *Saccharomyces cerevisiae* (МТСС 170), *Tricophyton rubrum* (МТСС 296). Бактериальные культуры выращивали при 37°C на агаризованной среде, содержащей (г/л): пептон – 5.0, мясной экстракт – 3.0, NaCl – 5.0, агар – 20.0. Культуры грибов выращивали при 28°C на декстрозном агаре Сабуро, содержащем (г/л): пептон – 10.0, глюкоза – 40.0, агар – 20.0 [8]. Все культуры хранили при 4°C и поддерживали, регулярными посевами.

Выращивание *S. rimosus* МТСС 10792 для получения антимикробных препаратов. Активный штамм Y8 засевали в 250 мл колбы Эрленмейера с 50 мл питательной среды, содержащей глюкозу, дрожжевой и солодовый экстракт. Культуру выращивали при 28°C и 180 об./мин на роторном шейкере. Через 3 дня 2% инокулята переносили в конические колбы, объемом 1.0 л, содержащие 200 мл глюкозно-соевой среды, следующего состава (г/л): глюкоза – 10.0, соевый экстракт – 10.0, NaCl – 10.0, CaCO₃ – 2.0. Культуру инкубировали в тех же условиях в течение еще 3 сут и на втором этапе использовали в качестве инокулята для фермен-

тации в 3 л реакторе, содержащем 1.5 л глюкозно-соевой среды. рН среды доводили до 7.5, скорость аэрации составила 1 об./об. мин. Образование пены подавляли с помощью стерильной силиконовой добавки (“Himedia”, Индия).

Выделение и очистка. Полученную в реакторе жидкую культуру фильтровали через фильтровальную бумагу (ватман № 1), затем фильтрат центрифугировали при 10000 g 20 мин. Прозрачный фильтрат исследовали на наличие антимикробной активности с различными штаммами микроорганизмов.

Экстракцию антимикробных соединений проводили *n*-бутанолом в соотношении 1 : 1 (об./об.). Органическую фазу выпаривали в вакууме на роторном испарителе при температуре 30°C. Очистку антимикробных агентов проводили с использованием колонки с силикагелем (3.2 × 62 см). Колонку предварительно оставляли на ночь для того, чтобы силикагель был полностью уравновешен гексаном. Для адсорбции на поверхность колонки с силикагелем наносили 10 г фильтрата. Элюцию проводили градиентом гексана и этилацетата (10–100%) с увеличением содержания этилацетата, затем следовала элюция этилацетатом и метанолом (10–50%), после чего использовался 100% метанол. Было отобрано шестнадцать фракций (по 2.5 мл каждая), в которых была протестирована антимикробная активность. Активные фракции объединяли, концентрировали и подвергали дальнейшей очистке (около 2.83 г) на второй кремниевой колонке с использованием системы растворителей этилацетат: метанол (2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 40.0, 50.0 и 100% метанол). Частично очищенный активный метаболит (300 мг) был дополнительно очищен с помощью ВЭЖХ, La Chrom, L-7400 (“Мерк”, Германия) в обращенно-фазовой колонке с диоксидом кремния (С-18) с использованием системы вода–ацетонитрил (80 : 20), элюцию проводили со скоростью 0.5 мл/мин. Выход веществ с колонки оценивали спектрофотометрически при длине волны 254 нм.

Физико-химические свойства антимикробных соединений. Спектр в ультрафиолетовой области (200–500 нм) получали в метаноле, регистрировали на спектрофотометре PerkinElmer Lambda-25 UV (“PerkinElmer”, США), инфракрасный (ИК) спектр на спектрометре FT-IR-PerkinElmer RX-1 (США) в области 200–4000 см⁻¹ с использованием методики с гранулированным КВг [15]. Масс-спектр получали на масс-спектрометре Micromass Quattro II (США). Для полного определения структуры были получены также ¹H- и ¹³C-спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) соединения в дейтерированной воде (D₂O), которые регистрировали на спектрометре Varian Inova Instrument (США) с частотой 300 МГц. Элементный

анализ был проведен с использованием прибора Carlo Erba 1106 CHNO /S (Великобритания). Температура плавления была определена с использованием WRS-1B цифрового аппарата плавления (“Zhengzhou Voke Instrument EquipmentCo”, Китай). Активные соединения, полученные при выращивании *S. rimosus* МТСС 10792, были определены в соответствии с рекомендованными международными стандартами [10–14].

Химические свойства антимикробных соединений. Были проведены следующие качественные реакции: Молиша, Фелинга, Сакагучи, Эрлиха, Миллона, Майера, реакция с нингидрином, нитропруссидом, реакция с сульфатом свинца и хлоридом железа [15].

Биологическая активность. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) очищенного антимикробного соединения рассчитывали, используя метод серийных разведений в соответствии с рекомендациями Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (2000 г.). Антимикробную активность оценивали с использованием микропланшетов с аламаровым синим (МАВА) [23].

Суспензии *M. tuberculosis* H37Ra и *M. tuberculosis* H37Rv готовили в концентрации $\sim 10^5$ кл./мл, после чего по 100 мкл вносили в каждую лунку планшета, где смешивали с исследуемым соединением, полученным из *S. rimosus* МТСС 10792 (концентрация 10 мкг/мл среды Мидлбрук 7Н9 [23]), чтобы конечный объем был равен 200 мкл. После 6 сут инкубации в лунки планшета добавляли 20 мкл красителя аламаровый синий, после чего анализировали результаты. Изменение цвета от голубого до розового было показателем роста *M. tuberculosis*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм-продуцент. Получен новый изолят *S. rimosus* Y8 из почвы заповедника Чхаттисгарх (Индия). Выделенный штамм обладал антимикробной активностью в отношении всех исследованных штаммов микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью, грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов. Исследование антимикробной активности показало следующие результаты: антигрибная активность составила 35 мм для *Sachromyces cereviseae* (МТСС 170), 32 мм для *Tricophyton rubrum* (МТСС 296), *Penicillium citrinum* (МТСС 1751), *Candida albicans* (МТСС 184), 28 мм для *Candida tropicalis* (МТСС 3017), 27 мм *C. albicans* (МТСС 1637), 19 мм для *Alternaria alternate* (МТСС 1779), 12 мм *Aspergillus fumigatus* (МТСС 2544), *Candida albicans* (МТСС 183), 10 мм *Aspergillus niger* (МТСС 872). Антибактериальная активность составила: 39 мм для *Staphylococcus aureus* (МТСС 96), 30 мм для *S. aureus*

(МТСС 737), 33 мм для *Salmonella typhi* (МТСС 531), 31 мм для *Bacillus cereus* (МТСС 1305), 26 мм для *B. cereus* (АТСС 10876), 29 мм для the *Bacillus subtilis* (МТСС 1789), *Bacillus megaterium* (МТСС 1684), 24 мм для *Proteus vulgaris* (МТСС 1771) и *Klebsiella pneumoniae* (МТСС 2405), 23 мм для *Staphylococcus epidermis* (МТСС 435) и *Bacillus pumilus* (МТСС 1607), 28 мм для *Escherichia coli* (АТСС 35218), 20 мм для *E. coli* (МТСС 739), 18 мм для *E. coli* (МТСС 1687), 13 мм для *E. coli* (МТСС 1667).

На среде ISP-2 штамм Y8 хорошо рос, образуя отдельные колонии. Цвет вегетативного мицелия – светло-желтый, цвет воздушного мицелия – грязно-белый. Изучение культурально-морфологических и физиологических свойств штамма Y8 показало, что исследуемый штамм близок к роду *Streptomyces*. Основываясь на данных гомологии 16S рРНК, штамм был отнесен к *Streptomyces rimosus* supsp. *rimosus* и ему был присвоен № 10792 МТСС. Проведено исследование фрагментов последовательности 16S рРНК штамма *S. rimosus*, обозначенного как Y8, методом анализа Basic Local Alignment Search (BLAST) с использованием базы данных NCBI. Соотнесение последовательностей ДНК позволило построить филогенетическое дерево методом “объединения соседей” с использованием MEGA 4.0.2 – биологически-ориентированных программ для эволюционного анализа ДНК и белковых последовательностей [16]. Результаты показали, что штамм Y8 был идентичен *Streptomyces rimosus* supsp. *rimosus* JCM4667 (№ в генбанке AB045883/2799), так как сходство последовательностей 16S рРНК этих двух бактерий составило 99.52%.

Ферментация, выделение и очистка. Оптимизацию условий выращивания проводили в лабораторном ферментере. За образованием антимикробного соединения и ростом биомассы следили в течение 14 сут (данные не представлены). Образование антибиотика детектировалось в культуральной жидкости после 12 ч. Концентрация антибиотика была максимальной (47 мг/л) в стационарной фазе после 96 ч инкубации. Максимальный выход антимикробных метаболитов наблюдали в поздней логарифмической фазе роста, т.е. синтез и выделение в среду происходили параллельно с ростом культуры. Было отмечено, что накопление других антибиотиков, таких как сефаломин С и клавулановая кислота в определенных средах, также наблюдалось параллельно с ростом микроорганизмов [17].

После окончания процесса ферментации культуральную жидкость фильтровали, центрифугировали при 10000–12000 g 15 мин. Осветленный фильтрат, содержащий активный метаболит, доводили до pH 7.0 и экстрагировали антимикробные вещества *n*-бутанолом соотношении 1 : 1 (об./об.). Органическую фазу выпаривали при комнатной

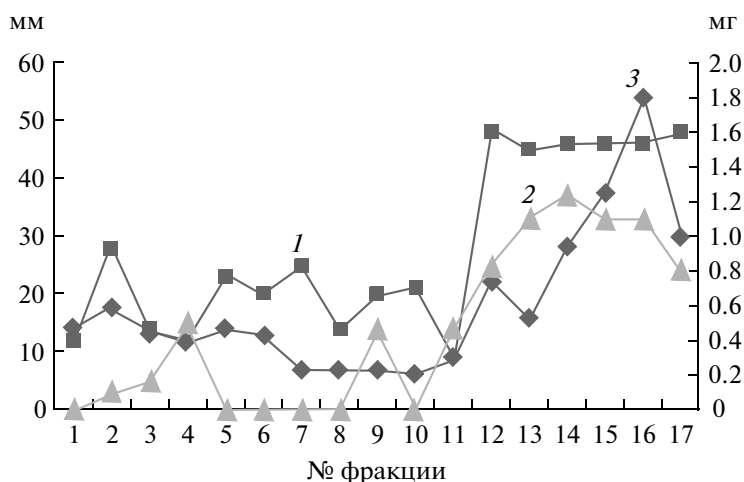


Рис. 1. Очистка содинений с антимикробной активностью из культуральной жидкости *S. rimosus* MTCC 10792 на колонке с силикагелем. 1 – *B. subtilis*; 2 – *C. albicans*; 3 – выделенное соединение (мг). Соотношение растворителей при элюции (№ фракции): 1 – 100% гексана, 2 – 10% этилацетат : гексан, 3 – 20% этилацетат : гексан, 4 – 30% этилацетат : гексан, 5 – 40% этилацетат : гексан, 6 – 50% этилацетат : гексан, 7 – 60% этилацетат : гексан, 8 – 70% этилацетат : гексан, 9 – 80% этилацетат : гексан, 10 – 90% этилацетат : гексан, 11 – 100% этилацетата, 12 – 10% метанол : этилацетат, 13 – 20% метанол : этилацетат, 14 – 30% метанол : этилацетат, 15 – 40% метанол : этилацетат, 16 – 50% метанол : этилацетат, 17 – 100% метанола.

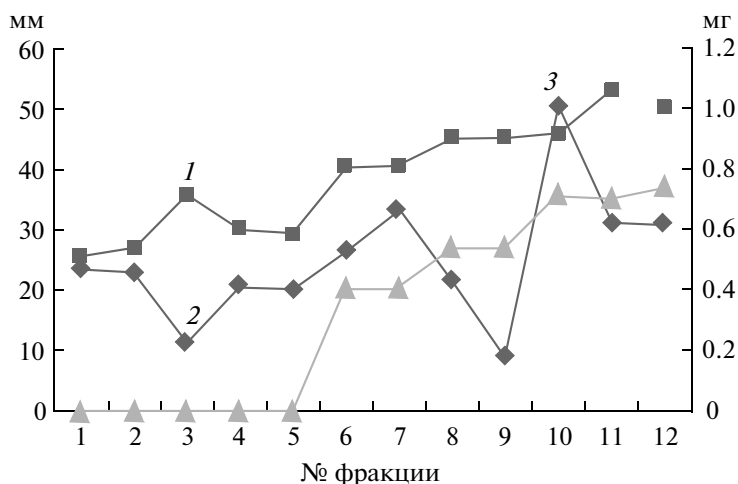


Рис. 2. Повторная хроматография активного метаболита *S. rimosus* MTCC 10792 на колонке с силикагелем. 1 – *B. subtilis*; 2 – *C. albicans*; 3 – выделенное соединение (мг). Соотношение растворителей при элюции (№ фракции): 1 – 100% этилацетата, 2 – 2.5% метанол : этилацетат, 3 – 5% метанол : этилацетат, 4 – 7.5% метанол : этилацетат, 5 – 10% метанол : этилацетат, 6 – 15% метанол : этилацетатацетат, 7 – 20% метанол : этилацетат, 8 – 25% метанол : этилацетат, 9 – 30% метанол : этилацетат; 10 – 40% метанол : этилацетат; 11 – 50% метанол : этилацетат, 12 – 100% метанола).

температуре и пониженном давлении на роторном испарителе. В результате был получен порошок темно-желтого цвета. Фракции, собранные после хроматографии на силикагеле в градиенте растворителя 10, 20, 30, 40, 50 метанол: этилацетат и 100%-ного метанола (об./об.) обладали антибактериальной активностью в отношении *B. subtilis* с зоной ингибирования от 45 до 48 мм. Эти фракции также показали противогрибковую активность в отношении *C. albicans* с зоной ингибирования от 24 до 37 мм (рис. 1). Наиболее активные фракции

были нанесены на вторую колонку с силикагелем. В ходе очистки было установлено, что наиболее активные фракции, обладающие значительной антибактериальной активностью, это 3–12, фракции с противогрибковой активностью – это фракции с 8 по 12 (рис. 2). Полученные после повторной очистки на силикагеле фракции, имеющие самые высокие показатели антибактериальной и противогрибковой активности объединяли (~2.83 г) и подвергали дополнительной очистке с использованием полупрепаративной ВЭЖХ в

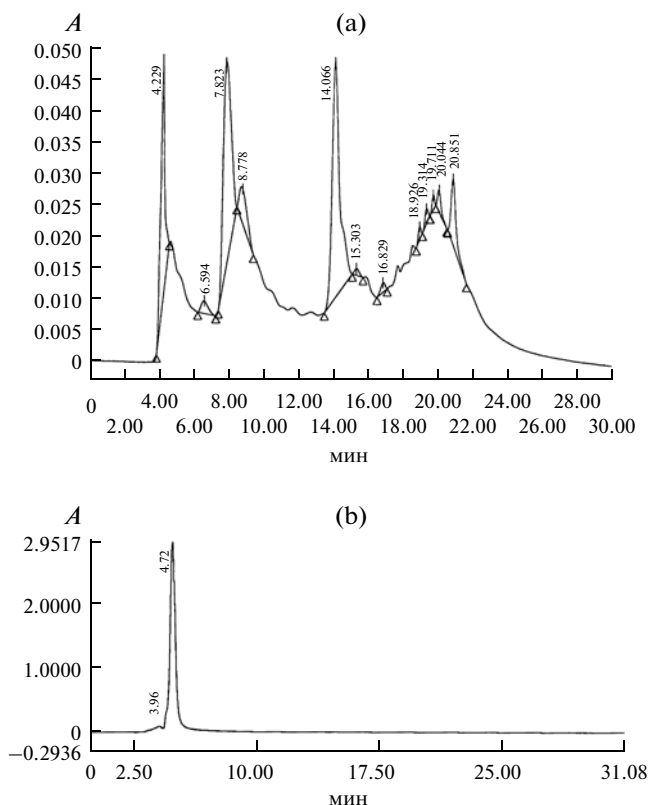


Рис. 3. ВЭЖХ частично очищенного активного метаболита из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792 после повторной хроматографии на колонке с силикагелем (а) и фракции 4.229 (б).

системе растворителей вода–ацетонитрил (80 : 20) с использованием С-18 колонки с обращенной фазой. Во фракциях определяли поглощение при 254 нм. По результатам очистки ВЭЖХ были собраны три основных пика с временами удерживания 4.229, 7.823 и 14.060 (рис. 3). Фракции собирали и тестировали на антимикробную активность. Пик, показавший время удерживания 4.229, обладал антибактериальной активностью, пик с временем удерживания 14.060 обладал противогрибковым действием. Три пика были дополнительно очищены с помощью ВЭЖХ, окончательно очищенный продукт с антибактериальной активностью имел время удерживания 4.7 мин при использовании системы растворителей вода–ацетонитрил (80 : 20) при 254 нм, с использованием С-18 колонки с обращенной фазой (рис. 3).

УФ-спектроскопия. УФ-спектр соединения с антимикробной активностью, выделенного из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792 (рис. 4), указывает на наличие в нем карбонильных групп и ароматических колец с максимумом поглощения при $\epsilon_{\text{макс}}$ (MeOH) 363 и 266 нм, что согласуется с результатами полученными другими авторами [18–20].

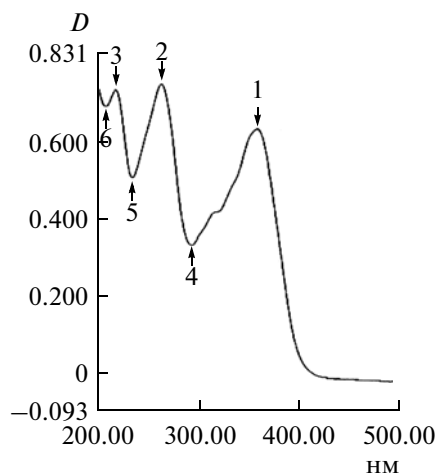


Рис. 4. УФ-спектр выделенного антибиотика. Пики 1 и 2 с максимумом поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$) при 363 нм и 266 нм соответствуют карбонильной группе и ароматическому кольцу, пик 3 вблизи 220 нм – пептидной группе, пик 4 с ($\lambda_{\text{макс}}$) 293 нм – карбонильной группе; пик 5 и 6 ($\lambda_{\text{макс}}$) 230 нм и 208 нм – амидной группе.

Масс-спектроскопия. Масс-спектр соединения с антимикробной активностью, выделенного из *S. rimosus* МТСС 10792, позволил определить молекулярную массу очищенного соединения, которая составляла 461.00 (рис. 5а). Это значение очень близко к молекулярной массе окситетрациклина (460.43) и указывает на то, что выделенное соединение принадлежит к группе окситетрациклина [20].

Элементный анализ. В результате элементного анализа соединения с антимикробной активностью, выделенного из культуральной среды *S. rimosus* МТСС 10792, были получены следующие значения для С = 57.39; Н = 4.98 и N = 6.15, что близко к значениям С = 57.20; Н = 5.21 и N = 6.08 (табл. 1) соответствующим эмпирической формуле $C_{22}H_{24}N_2O_9$ окситетрациклина.

Инфракрасная спектроскопия. ИК-спектр чистого соединения был получен с использованием гранул КВг [5]. В спектре присутствовали следующие пики (см^{-1}): 3351 (NH полоса, соответствующая колебаниям первичного амина), 3806 (OH полоса, соответствующая циклогексану), 3780 (CO–NH полоса – колебаниям амида или амидной карбонильной группы), 1627 (C=O), 1454 (C=C полоса соответствовала колебаниям Ar–H), 1358 (C–N полоса – колебания третичного амина или диметил-амин), 1235 (C–O полоса, соответствовала колебаниям вторичного спирта), 1175 (C–O полоса, колебаниям высшего спирта), 945 (C=C полоса, колебаниям алкена/C–H алкенов), 771 (ароматические C–H или ненасыщенным ароматические C–H) соответственно (рис. 5б) [21, 22].

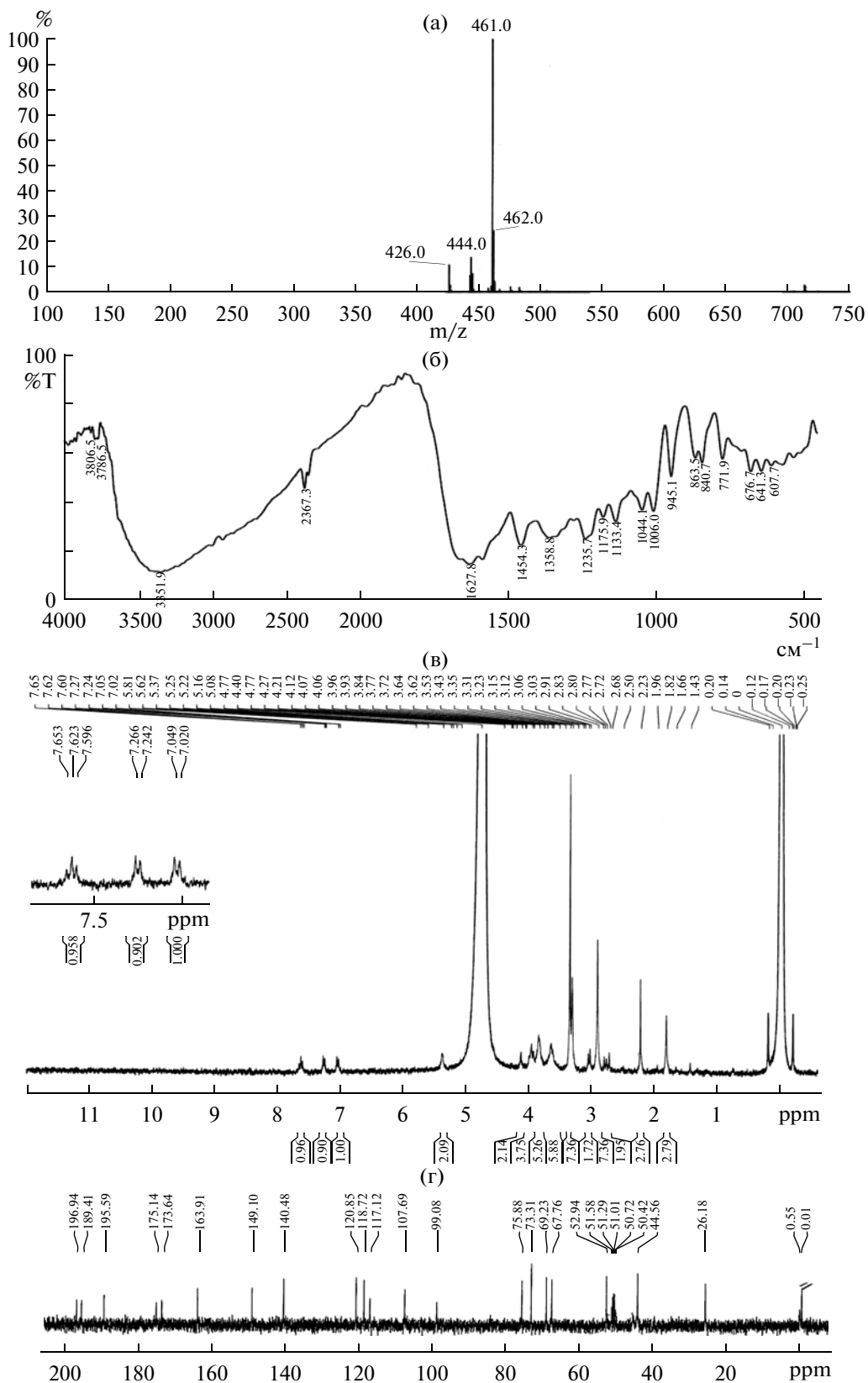


Рис. 5. Масс-спектр (а), ИК- (б), ^1H -ЯМР- (в) и ^{13}C -ЯМР-(г) спектры антимикробного соединения, выделенного из культуральной жидкости *S. rimosus* MTCC 10792.

Таблица 1. Сравнение соединения с антимикробной активностью, выделенного из культуральной среды *S. rimosus* МТСС 10792, с антибиотиком окситетрациклином

Свойства	Выделенное антимикробное соединение	Окситетрациклин
Температура плавления	185	183–185
Молекулярная масса	461	460.4
Химический анализ:		
С	57.2	57.39
Н	5.21	4.98
N	6.08	6.15
Формула	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉
Активен по отношению	Грам + и Грам-бактерии	Грам + и Грам-бактерии

Таблица 2. Химические тесты, проведенные для антимикробного соединения из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792

Химический тест	Результат	Комментарии
Реакция Молиша	Грам +	Наличие сахара
Реакция с нитропруссидом	Грам +	Присутствие аминов
Реакции с хлоридом железа	Грам –	Отсутствие ди-кетонов или енольной группы
Реакция Фелинга	Грам +	Присутствие свободных альдегидов и/или кетонов сахаров
Реакция Сакагучи	Грам –	Отсутствие Arg
Реакция с сульфатом свинца	Грам –	Отсутствие аминокислот, содержащих серу
Мейер реакции	Грам +	Присутствие нитро-группы
Реакция Эрлиха	Грам –	Отсутствие индольной группы
Реакция Милона	Грам –	Отсутствие тирозина
Реакция с нингидрином	Грам +	Присутствие свободной-NH ₂ группы
Реакция Толлена	Грам +	Отсутствие ароматического амина

¹H-ЯМР (D₂O обмен) δ. ¹H-ЯМР-спектр антимикробного соединения, выделенного из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792, показан на рис. 5в. На полученном спектре ¹H-ЯМР можно видеть следующие различные пики: 7.009–7.58 (m, 3H, CH от Ar–H), 2.25–5.00 (m, 4H, CH алифатического кольца) и 1.60–3.06 (s, 9H, CH от CH₃).

¹³C-ЯМР (D₂O обмен) δ. ¹³C ЯМР-спектр представлен на рис. 5г. На спектре представлены различные пики: 195.5–196.9 (>C=O или карбонил алифатического кольца); 175.15 (H₂N > C=O или карбонил амид); 163.9–189 (C=C или 1-этилен); 75.8–99.0 (1-этилен) или 75.8–189 (этилен или C=C алифатические соединений), 107–149 (Ar–H или фенил); 44.5–73.3 (циклогексан кольцо), 26.1–69.23 (–CH₃).

Физико-химические свойства антимикробного соединения. Антимикробное соединение из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792 было выделено в виде бледно-желтого порошка с температурой плавления 185°C с амфотерными свой-

ствами. Соединение легко растворялось в метаноле, соляной кислоте, этаноле, воде, *n*-бутаноле, ацетоне, этиловом спирте, бензоле и изопропиловом спирте, но не растворялось в петролейном эфире, гексане и хлороформе.

Химические свойства антимикробного соединения. Выделенное соединение дало положительные результаты в следующих тестовых реакциях: Молиша, в реакции с нитропруссидом, с раствором Фелинга, реакции Майяра, в тесте с нингидрином, в реакции серебряного зеркала. Результаты тестовых реакций с хлоридом железа, тестом Сакагучи, реакции с сульфатом свинца, реакции Эрлиха и реакция Миллона были отрицательными (табл. 2).

Биологическая активность выделенного соединения. Выделенное из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792 соединение обладало активностью против широкого спектра микроорганизмов, обладающих множественной резистентностью к лекарственным средствам, штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также противотуберкулезной активностью.

Таблица 3. Минимальная ингибирующая концентрация антимикробного соединения, выделенного из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792, и окситетрациклина

Исследуемый организм	Выделенное соединение, мкг/мл	Окситетрациклин, мкг/мл
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	25.00	—
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25.00	—
<i>Bacillus subtilis</i> (МТСС 1789)	6.25	6.25
<i>Bacillus pumilus</i> (МТСС 1607)	6.25	6.25
<i>Bacillus megaterium</i> (МТСС 1684)	12.50	6.25
<i>Bacillus cereus</i> (МТСС 1305)	12.50	6.25
<i>Bacillus cereus</i> (АТСС 10876)	12.50	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> (МТСС 96)	6.25	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> (МТСС 737)	6.25	6.25
<i>Staphylococcus epidermis</i> (МТСС 435)	6.25	6.25
<i>Salmonella typhi</i> (МТСС 531)	6.25	6.25
<i>Proteus vulgaris</i> (МТСС 1771)	12.50–25.00	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (МТСС 2405)	12.50–25.00	12.50
<i>Escherichia coli</i> (МТСС 1667)	6.25–12.50	12.50
<i>Escherichia coli</i> (АТСС 35218)	6.25–12.5	12.5

Выделенное соединение в концентрации 25 мкг/мл ингибировало рост *M. tuberculosis* H37Rv и *M. tuberculosis* H37Ra, что свидетельствовало о том, что выделено новое соединение, не выявленное ранее у штаммов *S. rimosus* (табл. 3).

Необходимость разработки новых антибиотиков для борьбы с бактериями, которые обладают множественной лекарственной резистентностью, представляет значительные трудности и ставит новые задачи перед биотехнологией и фармацевтической промышленностью. *S. rimosus* используется в промышленности для производства окситетрациклина. Штамм *S. rimosus* первоначально был выделен из почвы. Новый активный продуцент, идентифицированный как *S. rimosus* subsp. *rimosus* МТСС 10792 также выделен из почвы в заповеднике Чхаттисгарх (Индия) для исследования его антимикробной активности. Анализ выделенного из культуральной жидкости этого микроорганизма соединения показал, что оно принадлежит к группе окситетрациклина. Соединение обладало широким спектром антибактериальной активности как по отношению к грамположительным, так и грамотрицательным бактериям с множественной лекарственной резистентностью, а также противотуберкулезной активностью. Синтезируемое этим штаммом другое вещество, которое не было до конца очищено, показывало высо-

кую активность по отношению к грибам. В настоящее время его химическое строение изучается.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Orellana S., Soto C., Torala M.I. // Spectrochim. Acta. Part A. 2010. V. 75. № 1. P. 437–443.
2. Finlay A.C., Hobby G.L., Pan S.Y., Regna P.P., Routein J.B., Seeley D.B., Shull G.M., Sobin B.A., Solomons I.A., Vinson J.W., Kane J.H. // Science. 1950. V. 11. P. 85.
3. Alacevic M., Strasek-Vesligma J., Sermonti G. // J. Gen. Microbiol. 1973. V. 77. P. 173–185.
4. Friend E., Warren J., Hopwood M. // J. Gen. Microbiol. 1978. V. 106. P. 201–206.
5. Trew S.J., Wrigley S.K., Pairet L., Sohal J., Shanu-Wilson P., Hayes M.A., Martin S.M., Manohar R.N., Chicarelli-Robinson M.I., Kau D.A., Byrne C.V., Wellington E.M., Moloney J.M., Howard J., Hupe D., Olson E.R. // J. Antibiot. 2009. V. 53. № 1. P. 1–11.
6. Qiu Liu, Jicheng Yu., Jianfang Y., Xiaohui Q., Changjian L., Hua J. // J. Phytopathol. 2009. V. 157. № 5. P. 306–31
7. Cragg G.M., Newman D.J., Snader K.M. // J. Nat. Prod. 1997. № 1. V. 60. P. 52–60.
8. Hedge V.R., Puar M.S., Dai P., Pu H., Patel M., Anthes J.C., Richard C., Terracciano J., Das P.R., Gullo V. // J. Antibiotics. 2010. V. 54. № 2. P. 125–135.

9. *Shirling E.B., Gottlieb D.* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1966. V. 16. P. 313–340.
10. *Berdy J.* // Adv. Appl. Microbiol. 1974. V. 14. P. 309–406.
11. *Berdy J.* // Proc. Biochem. 1980. V. 15. P. 28–35.
12. *Berdy J.* CRC Handbook of Antibiotic Compounds. Florida 1. Boca Raton: CRC Press, 1980.
13. *Berdy J.* CRC Handbook of Antibiotic Compounds. Florida 2. Boca Raton: CRC Press, 1980.
14. *Umezawa H.* // Jpn. J. Antibiot. Suppl. 1977. V. 30. P. 138–163.
15. *Atta H.M.* // Am.-Eurasian J. Sci. Res. 2010. V. 5. № 1. P. 39–49.
16. *Sahin N., Ugar A.* // Turk. J. Biol. 2003. V. 27. P. 73–78.
17. *Saitou N., Nei M.* // Mol. Biol. Evol. 1993. V. 4. № 4. P. 406–25.
18. *Ueno R., Uno K., Aoki T.* // J. Chromatogr. 1994. V. 573. P. 333–335.
19. *Tokol J., Mastisova E.* // J. Chromatogr. A. 1994. V. 669. P. 75–80.
20. *Thomas M.H.* // J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1989. V. 72. № 4. P. 564–567.
21. *Sharma Y.R., Chand S.* Elementary Organic Spectroscopy: Principles and Chemical Applications. New Delhi: S. Chand and Co. Ltd. 2010.
22. *Silverstein R.M., Webster F.X.* Spectrometric Identification of Organic Compounds, Canada: John Wiley, 1998. P. 132–144.
23. *Collins L., Franzblau S.G.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1997. V. 41. № 5. P. 1004–1009.

Purification and Chemical Characterization of Antimicrobial Compounds from a New Soil Isolate *Streptomyces rimosus* MTCC 10792¹

N. Singh^a, V. Rai^a and C. K. M. Tripathi^b

^a Biochemistry and Microbiology Laboratory, School of Studies in Life Sciences
Pt. Ravishankar Shukla University, Raipur, 492010, India

^b Fermentation Technology Division, Central Drug Research Institute, CSIR, Chattar Manzil Palace, PO Box 173,
Lucknow, 226 001, India

e-mail: nevi0007@gmail.com

Received October 29, 2012

Abstract—A new isolate of *Streptomyces* sp. from soil of state Chhattisgarh (India) having broad spectrum antibacterial and antifungal activity was obtained. The active strain was identified as *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* with accession number MTCC 10792 based on physiological, biochemical characteristics and 16S rRNA sequence homology studies. Antimicrobial compound produced by *S. rimosus* was tested against the drug resistance pathogens by the Bauer and Kirby method. The crude active metabolite was extracted using solvent *n*-butanol and purified by silica column chromatography and HPLC method. The physico-chemical characteristics of the one purified compound viz. color, melting point, solubility, elemental analysis, ESIMS, IR, UV, ¹HNMR, ¹³CNMR and chemical reactions have been investigated. Purified antimicrobial compound produced by *S. rimosus* MTCC 10792 at concentration 25 µg/ml showed antitubercular activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra as well as broad activity against all tested bacterial and fungal pathogens.