

## ВОЗДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ И ФУНГИЦИДОВ НА ДИАТОМОВУЮ ВОДРОСЛЬ *NITZSCHIA PALEA* (KÜTZ.) W. SM. И СОПУТСТВУЮЩУЮ МИКРОФЛОРУ

В. Б. Багмет, Е. Ю. Егупова

Башкирский государственный университет, Уфа, РФ,  
chara1989@yandex.ru

Изучено воздействие некоторых антибиотиков и фунгицидов на два штамма вида *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm. и на сопутствующие микромицеты и бактерии. Микромицеты наиболее эффективно подавлялись амфотерицином В и флуконазолом, бактерии – комбинированным препаратом (флуконазол + ципролет). Исследуемые штаммы диатомеи оказались более чувствительны к антибиотикам, чем к фунгицидам.

*Ключевые слова:* *Nitzschia palea*, антибиотики, фунгициды, бактерии, микромицеты

Некоторые представители диатомовых водорослей обладают свойствами, позволяющими использовать их в биотехнологии, в частности для создания антибиотиков [1, 2]. В связи с этим возникает необходимость в аксеничных культурах водорослей, что является сложным процессом, поскольку эти организмы составляют консорциумы, включающие кроме самих водорослей сопутствующую микрофлору. Существуют методики по очистке водорослей от сопутствующих микроорганизмов [3–5]. Однако культуры диатомей весьма специфичны, и подбор метода очистки является сложной задачей. Отмечено, что развитие этих организмов в аксеничных культурах происходит медленнее и приводит к морфологическим и физиологическим изменениям [3]. Поэтому изучение воздействия различных, отличающихся по механизму и спектру действия антибиотиков и фунгицидов на диатомовые водоросли для выделения чистых культур является актуальной задачей. Цель работы – изучение воздействия антибиотиков и фунгицидов на рост и развитие представителей вида *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm. и на сопутствующую микрофлору.

**Материал и методы.** Для эксперимента использовали два штамма *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm.: Бр – выделен 15.09.2014 г. из пробы, отобранной 10.08.2014 в донных отложениях Рыбинского водохранилища, рядом с поселком Борок (Ярославская область); Пк9ж – выделен 04.10.2013 г. из пробы, отобранной 06.01.2012 г. в донных отложениях ручья Марсианский, пещера Геологов-2 (Пермский край). Штаммы идентифицированы молекулярно-филогенетическим методом путем сравнения нуклеотидных последовательностей гена *RbcL* с использованием базы данных NCBI [6]. Культуры выращивали на жидкой минеральной среде DM [7]. В исследовании использовали антибиотики (тетрациклин, фуразолидон, ципролет) и фунгициды (нистатин, флуконазол, амфотерицин В) широкого спектра действия. Отдельные антибиотики, фунгициды и их комбинации добавляли в жидкую питательную среду, разливали в пробирки и вносили исследуемый штамм водоросли с концентрацией  $2 \cdot 10^4$  клеток/см<sup>3</sup>. Для контроля использовали минеральную среду без антибиотиков и фунгицидов. Штаммы культивировали при дневном освещении в течение 5 суток при комнатной температуре, затем оценивали их рост визуально и под световым микроскопом. Для выявления роста сопутствующей микрофлоры штаммы после культивирования в среде с антибиотиками и фунгицидами пересеивали на картофельный агар с глюкозой (10 г/л).

**Результаты и обсуждение.** Концентрации всех исследованных антибиотиков свыше 50 мкг/мл вызывали задержку в развитии водорослей – хлоропласт был сжатым, изредка встречались мертвые клетки, по сравнению с контролем численность клеток была ниже (табл. 1). Тетрациклин в концентрации 75 мкг/мл полностью подавил рост диатомей. Начиная с концентрации 200 мкг/мл была подавлена бактериальная микрофлора, однако во всех вариантах опыта активно развивались колонии грибов. К воздействию фуразолидона и ципролета диатомеи были более устойчивыми – летальной оказалась концентрация 100 мкг/мл. При использовании фуразолидона не было обнаружено колоний грибов, хотя бактериальная флора развивалась хорошо даже при концентрации 300 мкг/мл. Возможно, это связано с тем, что этот препарат активен в отношении грамотрицательных аэробных микроорганизмов, в меньшей степени к нему чувствительны грамположительные микроорганизмы и некоторые простейшие и грибы [8]. Использование ципролета сократило разнообразие бактериальной микрофлоры, но также не помогло подавить рост сопутствующей микрофлоры – при всех концентрациях выявлен один вид бактерии и активно развивались колонии грибов.

Нистатин полностью подавил рост микромицетов, но не повлиял на численность микробной микрофлоры. Его использование при концентрации 75 мкг/мл начало оказывать альгостатическое действие, а концентрация 150 мкг/мл оказалась летальной для штамма Бр. Амфотерицин В при концентрациях до 75 мкг/мл не оказывал влияния на водоросли. С повышением концентрации до 100 мкг/мл наблюдалась задержка скорости роста диатомеи, при концентрации 150 мкг/мл погибли около половины клеток, при 200 мкг/мл погибли все клетки. Флуконазол практически не повлиял на штаммы диатомей. При концентрации 200 мкг/мл начала снижаться скорость размножения штаммов, но граница летального воздействия так и не была установлена. По-видимому, это связано с целенаправленным механизмом воздействия флуконазола: угнетение грибкового 14 альфа-ланостерол-диметилирования, опосредованного цитохромом P450, что является неотъемлемым этапом биосинтеза грибкового эргостерола [9].

Для максимально эффективной очистки штаммов *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm. от микрофлоры использовали комбинированный препарат из наиболее активных антибиотика (ципролет) и фунгицида (флуконазол).

Комбинированный препарат оказал более сильное воздействие на штаммы диатомеи и бактерии. Для штаммов водорослей летальной стала концентрация 100 мг/л флуконазола + 50 мкг/мл ципролета. В большинстве вариантов опыта активно развивались микромицеты. Это свидетельствует о том, что 100 мкг/мл – слишком низкая концентрация флуконазола и она оказывает лишь фунгистатическое воздействие. При концентрации 100 мг/л флуконазола + 40 мкг/мл ципролета бактерии полностью погибли (табл. 1).

Выявлено, что при очистке штаммов диатомеи от бактерий с использованием антибиотиков начинали массово развиваться микромицеты, хотя в контроле такого развития не наблюдалось. Применение фунгицидных препаратов привело к обратному эффекту – к увеличению числа колоний бактерий. Возможно, это вызвано тем, что при использовании антибиотика или фунгицида часть микрофлоры уничтожалась, и начинали активно развиваться бактерии или микромицеты, занимая освободившуюся экологическую нишу. Исследуемые штаммы *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm. оказались более чувствительны к антибиотикам, чем к фунгицидам. Возможно, это вызвано тем, что водоросли и некоторые виды бактерий находятся в симбиотической взаимосвязи [10].

Табл. 1 Устойчивость водорослей к антибиотикам

Антибиотики и фунгициды	мкг/мл	Жизнеспособность организмов					
		Штамм Бр	Микромицеты	Бактерии	Штамм Пк9ж	Микромицеты	Бактерии
Контроль	0	++	+	++	++	+	++
Амфотерицин В	10	нд	нд	нд	++	+	+
	25	нд	нд	нд	++	-	+
	50	++	-	++	++	-	+
	75	++	-	++	++	-	+
	100	+	-	++	+	-	++
	150	+	-	++	+	-	++
	200	-	-	++	-	-	++
Нистатин	50	++	+	+	нд	нд	нд
	75	+	-	++	нд	нд	нд
	100	+	-	++	нд	нд	нд
	150	-	-	++	нд	нд	нд
	200	-	-	++	нд	нд	нд
Тетрациклин	50	+	+	++	+	+	++
	75	-	+	++	-	+	++
	100	-	+	++	-	+	++
	150	-	+	+	-	+	+
	200	-	++	-	-	++	-
Флуконазол	50	++	+	+	++	+	+
	75	++	+	+	++	+	+
	100	++	-	+	++	-	+
	200	++	-	+	++	-	+
	250	+	-	+	++	-	+
	300	+	-	+	+	-	+
	350	+	-	+	+	-	+
Фуразолидон	50	+	-	++	нд	нд	нд
	75	+	-	++	нд	нд	нд
	100	-	-	++	нд	нд	нд
Ципролет	50	+	+	+	+	+	+
	75	+	+	+	+	+	+
	100	-	+	+	-	+	+
Флуконазол + ципролет	100+5	++	++	++	++	-	++
	100+10	++	+	+	++	+	+
	100+20	++	+	+	++	+	+
	100+30	+	+	-	+	+	+
	100+40	+	+	-	+	+	-
	100+50	-	+	-	-	+	-

Примечание: водоросли: ++ – рост активный, более 100 клеток в поле зрения; + – рост сдержанный, < 100 клеток в поле зрения, хлоропласт сжатый; - – организм погиб; микромицеты и бактерии: ++ – более 10 КОЕ в чашке Петри; + – менее 10 КОЕ в чашке Петри; - – организм отсутствует

**Выводы.** Выявлены наиболее эффективные фунгициды (амфотерицин В, концентрация выше 50 мкг/мл; флуконазол, концентрация выше 100 мкг/мл), которые, полностью подавляя микромицеты, оказывали на штаммы Бр и Пк9ж диатомеи *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm. минимальное воздействие. Полного очищения исследуемых штаммов от бактериальной флоры удалось достичь с помощью комбинированного препарата (флуконазол, концентрация 100 мг/л, и ципролет, концентрация 40 мкг/мл). При ингибировании роста бактериальной микрофлоры начинают активно развиваться микромицеты, при использовании фунгицидов массово развиваются бактерии. Исследуемые штаммы *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm. оказались более чувствительны к антибиотикам, чем к фунгицидам.

1. Harith K. Binea, Thaer I. Kassim, Ahmed K. Binea. Antibacterial activity of diatom *Nitzschia palea* (Kuetz.) W. Sm. extract // Iraqi J. Biotech. 2009. V. 8 (2). P. 562–566.
2. Kellam S. J., Walker J. M. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture // Br. Phycol. J. 1989. V. 24. P. 191–194.
3. Сиренко Л. А., Сакевич А. И., Осипов Л. Ф., Лукина Л. Ф., Кузьменко М. И., Козицкая В. Н. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наукова думка, 1975. 248 с.
4. Guillard R. R. L. Purification methods for microalgae / Andersen R. A. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, 2005. P. 117–132.
5. Рябова А. С., Назарова Т. А., Кузьмина Л. Ю., Абдуллин Ш. Р. Действие антибиотиков и ультрафиолетового излучения на цианобактерии, диатомеи и зеленые водоросли // Известия Уфимского научного центра РАН. 2015. № 4. С. 131–133.
6. <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>.
7. Mann D. G., Chepurnov V. A. What have the Romans ever done for us? The past and future contribution of culture studies to diatom systematics // Nova Hedwigia. 2004. № 79. P. 237–291.
8. Сипливый В. А., Дронов А. И., Конь Е. В., Евтушенко Д. В. Антибиотики и антибактериальная терапия в хирургии. – Киев, 2006. 100 с.
9. Лабинский Р. В., Дашко М. А. Использование препарата «дифлюзол» в лечении микозов разной этиологии // Микология и демодекоз. № 2. 2007. С. 1–4.
10. Stewart J. E., Marks L. J., Wood C. R., Risser S. M., Gray S. Symbiotic relations between bacteria and the domoic acid producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* and the capacity of these bacteria for gluconic acid/gluconolactone formation // Aquatic microbial ecology. 1997. V. 12. P. 211–221.

**THE EFFECTS OF ANTIBIOTICS AND FUNGICIDES  
ON THE DIATOM *NITZSCHIA PALEA* (KÜTZ.) W. SM.  
AND IT'S ASSOCIATED MICROFLORA**

V. B. Bagmet, E. Yu. Egupova

Bashkir State University, Ufa, RF,  
chara1989@yandex.ru

The effects of some antibiotics and fungicides on two strains of the species *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm. and concomitant micromycetes and bacteria were studied. Micromycetes are most effectively suppressed by amphotericin B and fluconazole, the bacteria – by combined medication (fluconazole + tsiprolet). The studied strains of the diatom were more sensitive to antibiotics than the fungicides.

*Key words:* *Nitzschia palea*, antibiotics, fungicides, bacteria, micromycetes