



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos bakalauro studijų programos

4 kurso studentė

Augustė URBAKONYTĖ

**Biologiškai aktyvias medžiagas produkujančių aktinobakterijų poveikis
patogeninėms mielėms**

Bakalauro baigiamasis darbas

Darbo vadovė:

dr. J. Švedienė

Vilnius 2020

Biologiškai aktyvias medžiagas produkuojančių aktinobakterijų poveikis patogeninėms mielėms

Darbas atliktas

Gamtos tyrimų centre, Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje.

Darbą atliko: Augustė URBAKONYTĖ

Darbo vadovė: dr. J. ŠVEDIENĖ

TURINYS

IVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. <i>Actinobacteria</i> skyrius	9
1.1.1. <i>Actinobacteria</i> skyriaus taksonomija ir savybės	9
1.1.2. <i>Actinobacteria</i> morfologija	11
1.1.3. <i>Actinobacteria</i> buveinės.....	12
1.1.4. <i>Actinobacteria</i> augimo sąlygos	13
1.1.4.1. Augimo priklausomybė nuo anglies šaltinio.....	13
1.1.4.2. Augimo priklausomybė nuo pH reikšmių.....	14
1.1.4.3. Augimo priklausomybė nuo temperatūros.....	14
1.1.5. <i>Streptomyces</i> gentis	14
1.1.5.1. <i>Streptomyces</i> gyvenimo ciklas	15
1.2 <i>Actinobacteria</i> išskiriami antriniai metabolitai	16
1.2.1. Antrinių metabolitų sintezei reikalingos sąlygos	16
1.2.2. Antrinių metabolitų sintezės priklausomybė nuo anglies šaltinio.....	17
1.2.3. Antrinių metabolitų sintezės priklausomybė nuo azoto šaltinio	17
1.2.4. Antrinių metabolitų sintezės priklausomybė nuo mineralinių medžiagų.....	17
1.3. <i>Actinobacteria</i> sintetinami antibiotikai	18
1.3.1. Skirtingų <i>Actinobacteria</i> genčių sintetinami antibiotikai ir jų panaudojimas.....	18
1.4. <i>Streptomyces</i> sintetinamos kitos bioaktyvios medžiagos	19
1.4.1. <i>Streptomyces</i> sintetinami fungicidai ir jų panaudojimas.....	20
1.4.2. <i>Streptomyces</i> sintetinami fermentai ir jų panaudojimas.....	20
1.4.3. <i>Streptomyces</i> sintetinamos paviršiaus aktyviosios medžiagos ir jų panaudojimas .	21
1.4.4. <i>Streptomyces</i> sintetinami vitaminai ir jų panaudojimas	22
1.4.5. <i>Streptomyces</i> sintetinami pigmentai.....	22
1.4.6. <i>Streptomyces</i> sintetinami antioksidantai ir jų panaudojimas.....	22
1.5 Grybines ligas sukeliančios mielės.....	22
1.5.1. <i>Candida</i> gentis.....	23
1.5.1.1. <i>Candida parapsilosis</i>	23
1.5.1.2. <i>Candida albicans</i>	24
1.5.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	26
2.1 Terpės	26

2.2.1 Aktinobakterijų izoliatai.....	28
2.2.2 Mielų kamienai.....	28
2.3 Reagentai	28
2.4 Prietaisai	29
2.5 Tyrimo metodai	30
2.5.1. Aktinobakterijų izoliatų gryninimas ir kultivavimas	30
2.5.2. Biologiškai aktyvių aktinobakterijų izoliatų paieška	30
2.5.3. Biologiškai aktyvių aktinobakterijų izoliatų kultivavimas ant skirtingų anglies šaltinių.....	31
2.5.4. Aktinobakterijų izoliatų augimo ir biologinio aktyvumo priklausomybė nuo skirtingos terpės pH reikšmės	31
2.5.5. Aktinobakterijų izoliatų biologinio aktyvumo tyrimas skirtingais metodais	31
2.5.6. Statistinis duomenų apdorojimas	32
3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	33
3.1.1 Biologiškai aktyvias medžiagas produkuojančių aktinobakterijų paieška.....	33
3.1.2 Biologiškai aktyvias medžiagas produkuojančių aktinobakterijų gebėjimo augti su skirtingais anglies šaltiniais vertinimas.....	33
3.2.1. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Saccharomyces cerevisiae</i> α'1 mielėms, tiriamas diskų metodu	34
3.2.2. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Saccharomyces cerevisiae</i> α'1 mielėms, tiriamas taško metodu	36
3.3.1. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Candida parapsilosis</i> mielėms, tiriamas diskų metodu	38
3.3.2. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Candida parapsilosis</i> mielėms, tiriamas taško metodu	39
3.4.1. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Candida albicans</i> mielėms, tiriamas diskų metodu	40
3.4.2. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Candida albicans</i> mielėms, tiriamas taško metodu.....	42
3.5.1. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mielėms, tiriamas diskų metodu.....	44
3.5.2. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mielėms, tiriamas taško metodu.....	45
3.6.1. Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Saccharomyces cerevisiae</i> α'1 mielėms, tiriamas diskų metodu.....	47
3.6.2 Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Saccharomyces cerevisiae</i> α'1 mielėms, tiriamas taško metodu.....	48
3.7.1. Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Candida parapsilosis</i> mielėms, tiriamas diskų metodu.....	50

3.7.2. Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Candida parapsilosis</i> mielėms, tiriamas taško metodu	51
3.8.1. Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Candida albicans</i> mielėms, tiriamas diskų metodu	53
3.8.2. Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Candida albicans</i> mielėms, tiriamas taško metodu	54
3.9.1. Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mielėms, tiriamas diskų metodu	55
3.9.2. Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mielėms, tiriamas taško metodu	56
3.10. Rezultatų aptarimas ir tolimesnės tyrimo kryptys	58
IŠVADOS	61
SANTRAUKA	62
SUMMARY	63
LITERATŪROS SĄRAŠAS	64
Priedai	68

IVADAS

Šiomis dienomis, patogeniniams mikroorganizmams vis greičiau įgaunant atsparumą antibiotikams ir išsivystant naujoms bakterinėms infekcijoms iškyla didelis poreikis naujų, ypač natūralių ir biologiškai aktyvių medžiagų [Rangseekaew ir Pathom-Aree, 2019]. Nors antimikrobinių medžiagų kūrimas cheminiu keliu turi daug perspektyvų, natūralios bioaktyvios medžiagos išlieka pranašesniais vaistų pirmtakais (apie 300 kartų didesnė vaistų pasisekimo tikimybė) [Kemung ir kt., 2018].

Dažniausiai antibiotikų veikliosioms medžiagoms gauti naudojamos mikroorganizmų išskiriamos medžiagos. Deja, pacientai dažnai nesilaiko antibiotikų vartojimo rekomendacijų ir naudoja nepakankamas jų dozes arba sutrumpina gydymo trukmę, todėl infekcijas sukeliantys mikroorganizmai įgauna tam tikrą atsparumą. Tai vyksta horizontaliosios genų pernašos būdu, kuomet atsparumo ar antibiotikų nukenksminimo mechanizmus koduojantys genai perleidžiami vieno mikroorganizmo kitiems [Das ir kt., 2018]. Neseniai atsiradus ypač vaistams atspariems *S. aureus*, *M. tuberculosis* ir kitų bakterijų kamienams, iškilo dar didesnė naujų antimikrobinių medžiagų svarba. Tokie kamieniai – vadinamosios „superbug“ bakterijos – tai atsparumą daugeliui arba visiems šiuo metu žinomiems antibiotikams įgavę komensaliniai mikroorganizmai (pvz., meticilinui atsparus *S. aureus*, MASA) arba patekę oportunistiniai patogenai, pvz. *P. aeruginosa* [Peterson ir Kaur, 2018]. „Superbug“ bakterijų kamieniai sukelia didelį bakterinių infekcijų pavojų, ypač hospitalinių infekcijų atveju. Dėl didelės žmonių migracijos bei globalizacijos, atsparių bakterijų plitimas visuomenėje auga, todėl ieškoma naujų ar/ir stipresnių bei platesnio veikimo spektro antibiotikų, vakcinų, kurios sustabdytų jų plitimą, bei gilinamasi į bakterijų virulentiškumo mechanizmus ir fagų terapiją [Bravo ir kt., 2018; Das ir kt., 2018].

Dauguma antibiotikų ir kitų biologiškai aktyvių medžiagų išskiriama iš dirvožemyje gyvenančių mikroorganizmų. Tai bakterijų *Bacillus* ir *Streptomyces*, bei grybų *Penicillium* ir *Cephalosporium* gentys. Vienos iš svarbiausių tokias medžiagas dirvožemyje išskiriančių bakterijų yra *Actinobacteria* – jos gamina maždaug du trečdalius žinomų antibiotikų [Das ir kt., 2018]. Be antibiotikų, minėtos bakterijos, o ypač *Streptomyces* gentis, išskiria kitas bioaktyvias medžiagas, tokias kaip fermentai, augalų augimą skatinančios medžiagos, natūralūs dažai ir fermentų inhibitoriai. Medicinoje, biotechnologijoje bei žemdirbystėje naudojami tokie *Actinomycetales* eilės sintetinami antibiotikai, kaip streptomocinas, eritromocinas, vankomicinas ir kiti [Yi Jiang ir kt., 2015]. Nors tyrinėjant mikroorganizmus ir būtent

aktinobakterijas išskirtos vienos svarbiausių antibiotikų klasių, tokios kaip tetraciklinai, aminoglikozidai, makrolidai, β -laktamai ir kitos, esant dideliu naujų medžiagų poreikiui, tokio pobūdžio tyrimai turi būti labai intensyvūs, nes dažniausiai atrandamos jau tos pačios biologiškai aktyvių medžiagų grupės. Taigi, norint atrasti naują, veiklią medžiagą, reikia ištirti milijonus bakterijų [Thaker ir kt., 2013].

Aktinobakterijos – vienas didžiausių *Bacteria* domeno skyrių, pasižymintis dideliu guanino ir citozino bazių kiekiu jų DNR sekoje. Tai filamentinės – Gram-teigiamos bakterijos, daugiausia laisvai gyvenančios dirvožemio bei vandens ekosistemose [Barka ir kt., 2016]. Morfologiškai jos primena grybų micelį ir tarpusavyje skiriasi gyvenimo būdu bei sąveikomis su kitais organizmais. Šiam skyriui priklauso patogenai, tokie kaip *Mycobacterium*, *Nocardia* bei *Propionibacterium*, augalų komensalai ir dirvožemio bakterijos (*Streptomyces* gentis) [Hussein ir kt., 2018].

Nors identifikuota, aprašyta ir antibiotikų gamybai naudojama tikrai daug mikroorganizmų, tačiau apie 90 % jų nekultivuojami. Norint atrasti naujas antibiotikų grupes, reikia ieškoti naujų biologiškai aktyvias medžiagas sintetinančių mikroorganizmų rūšių ir kamienų bei jų identifikacijos ir kultivavimo metodų [Yi Jiang ir kt., 2015]. Kaip jau minėta, tam reikia ištirti daugybę aktinobakterijų kultūrų, žinant, kaip retai atrandamos dar neaprašytos biologiškai aktyvios antimikrobinės medžiagos. Vis daugėja naujų ir dar tinkamai neištirtų aktinobakterijų buveinių tyrimų [Shaik ir kt., 2017]. Ne mažiau svarbu išsiaiškinti, kokias medžiagas ir kokiomis sąlygomis išskiria jau tyrinėti aktinobakterijų kamienai, bei kaip optimizuoti didžiausią išskiriamos medžiagos poveikį. Keičiant aktinobakterijų kultivavimo sąlygas galima stebėti kaip keičiasi jų antrinių metabolitų poveikis patogeniniams mikroorganizmams, pvz. mielėms ar antibiotikams atsparioms bakterijoms, todėl šio darbo pagrindinis objektas – skirtingomis sąlygomis kultivuotų aktinobakterijų izoliatų produkuojamų bioaktyvių medžiagų poveikio patogeninėms mielėms įvertinimas.

Darbo tikslas:

Įvertinti kultivavimo sąlygų įtaką aktinobakterijų gebėjimui produkuoti bioaktyvias medžiagas ir įvertinti jų poveikį eukariotiniams patogeniniams mikroorganizmams.

Darbo uždaviniai:

1. Augimą reguliuojančiomis sąlygomis (mitybinė terpė su įvairiais anglies šaltiniais, bei skirtingos pH reikšmės) kultivuoti biologiškai aktyvias medžiagas produkuojančius aktinobakterijų izoliatus.
2. Skirtingais metodais įvertinti aktinobakterijų izoliatų produkuojamų biologiškai aktyvių medžiagų poveikį patogeninėms mielėms.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

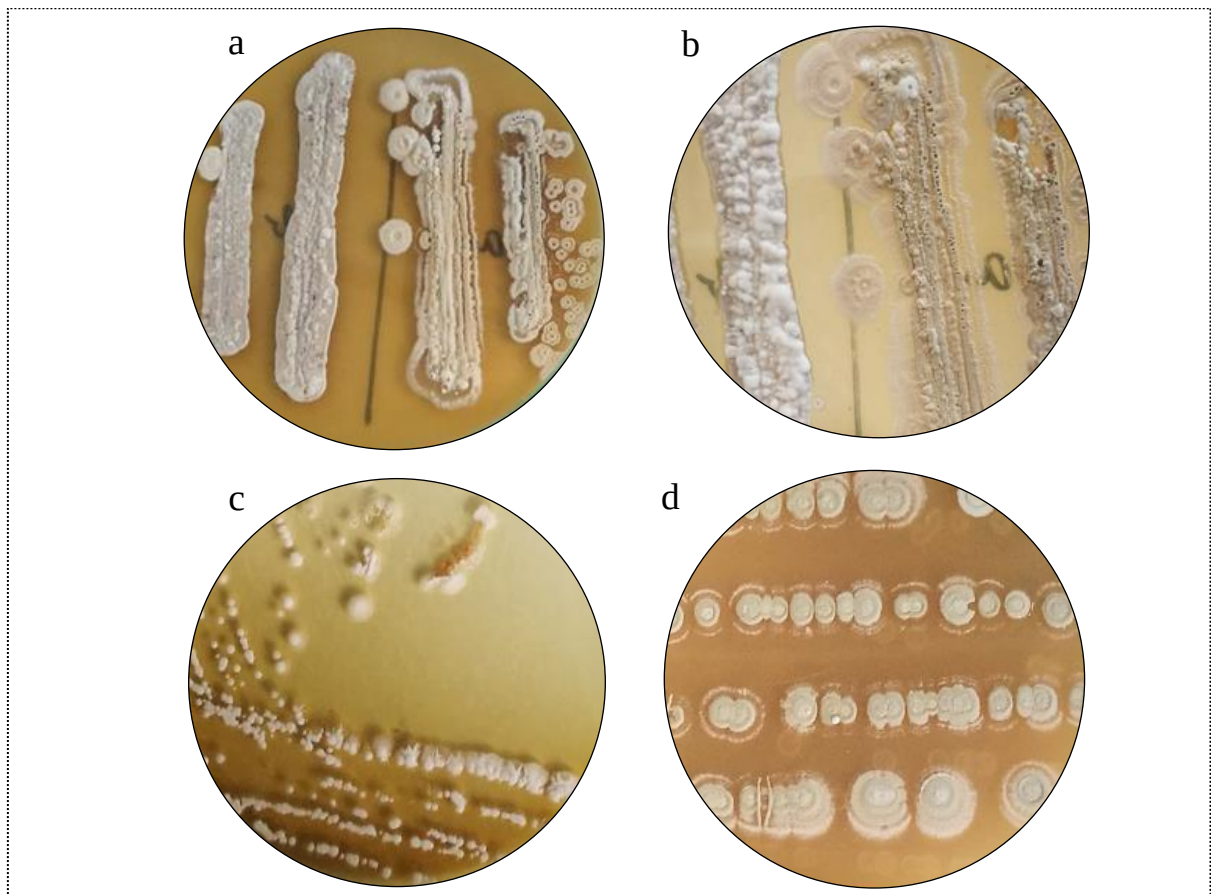
1.1. *Actinobacteria* skyrius

Actinobacteria skyrius – vienas didžiausių *Bacteria* domene. Jam priklauso skirtingos fiziologijos, morfologijos ir metabolinių požymių mikroorganizmai [Barka ir kt., 2016]. Šis skyrius skirstomas į šešias klases: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* ir *Thermoleophilia* [Anandan ir kt., 2016]. *Actinobacteria* klasė skirstoma į 16 eilių, iš kurių svarbiausios *Actinomycetales* ir *Bifidobacteriales* [Barka ir kt., 2016]. Kaip jau minėta, dirvožemyje daugiausiai aptinkama *Streptomyces* gentis, *Micromonospora* ir *Nocardia* gentys. Taksonomiškai rūšys identifikuojamos remiantis 16s rRNR sekomis bei DNR hibridizacija [Anandan ir kt., 2016]. Viena iš išskirtinių *Streptomyces* savybių, tai didelis guanino ir citozino bazių kiekis genome (apie 70 %, kai pvz. *Bacillus subtilis* genome – 40 %) [Kemung ir kt., 2018].

1.1.1. *Actinobacteria* skyriaus taksonomija ir savybės

Aktinobakterijos taksonomiškai skirstomos pagal morfologinius požymius, tokius kaip pigmentacija bei orinio ir substratinio micelio spalva. Šviesinės mikroskopijos pagalba nustatoma micelio fragmentacija, sporų forma ir struktūra [Anandan ir kt., 2016]. Pagal orinio micelio bruožus, tokius kaip paviršiaus struktūra (glotnus, grūdėtas, pūkuotas ar birus), pigmentacija ir specifinės apskritimo formos zonos aplink pavienes kolonijas (1 pav.), išskirtas *Actinobacteria* galima skirstyti į rūšis [Anandan ir kt., 2016].

Be mikroskopavimo metodo, aktinobakterijų skyrius skirstomas į rūšis bei gentis chemotaksonomijos pagalba. Šiais metodais vertinama ląstelės sienelės struktūra bei angliavandenių pasiskirstymas joje [Barka ir kt., 2016]. Be to, tiriamas sienelės peptidoglikano tipas, riebalų rūgščių grandinės ir fosfolipidai [Hasani ir kt., 2014].

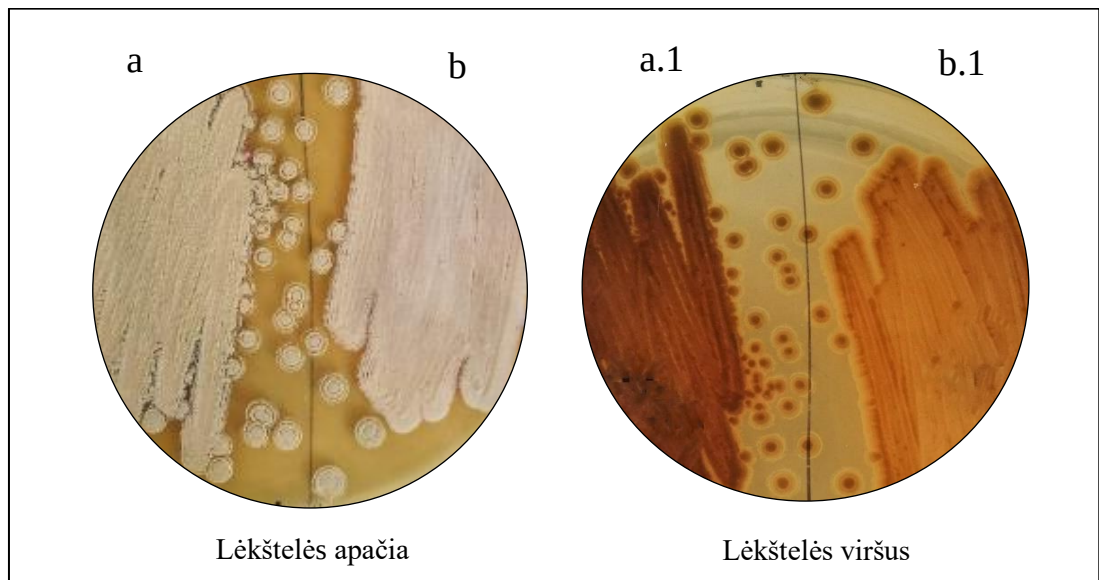


1 pav. Įvairūs *Actinobacteria* izoliatai ant Čapeko peptono agaro mitybinės terpės a-d. Individualių kolonijų morfologija – b,d. Grūdėtas micelio paviršius – b, birus micelio paviršius ir specifinės apskritimo formos zonos aplink pavienes kolonijas – d.

Kitaip nei bakterijos *Bacillus subtilis* ir *Escherichia coli*, *Streptomyces* genties bakterijos auga prailgindamos vegetatyvinio micelio hifų galiukus ir šakodamos filamentus, o ne įterpdamos naujus sienelės fragmentus sienelės viduryje. Micelio fragmentams ilgėjant, jie pusiau atskiriami nereguliariomis ir skirtingo storio septomis. Tyrimais įrodyta, jog septos pasižymi kanalų sistema, kuri leidžia tarp atskirtų hifų dalių perduoti medžiagas. Todėl filamentinės *Streptomyces* bakterijos primena daugialąstelinius mikroorganizmus [Barka ir kt., 2016; Wink ir kt., 2017]. Dėl augimo miceline forma ir skleidžiamo kvapo aktinobakterijos primena grybus, tačiau ląstelės sienelės struktūra labiau primena bakterijas. Sienelė pasižymi peptidoglikano sluoksniu ir techoinėmis rūgštimis, tačiau neturi chitino ir celiuliozės (kurie būdingi grybinių ląstelių sienelėse) [Ser ir kt., 2017]. Dėl peptidoglikano sienelės ir nukleoido, aktinobakterijos gali būti paveikiamos antibiotikais. Visa tai parodo, kad aktinobakterijų skyrius sieja grybų ir bakterijų domenų, todėl kartais jos yra vadinamos aktinomicetais pagal *Actinomycetales* eilę [Barka ir kt., 2016].

1.1.2. *Actinobacteria* morfologija

Aktinobakterijos – tai vienaląsčiai filamentiniai mikroorganizmai, ir skystose, ir standžioje terpėje formuojantys substratinį micelį, o ant standžios terpės paviršiaus dažniausiai formuojantys ir orinį micelį [Anandan ir kt., 2016]. Dauguma aktinobakterijų dauginasi sporuliacijos būdu – konidijomis, o auga prailgindamos hifų galiukus, ląstelei dalijantis pusiau. Sporuliavimo metu orinis (*Streptomyces* genties) micelis sintetina sporas, o joms dygstant formuojasi substratinis micelis, kuris pasisavina terpės maistines medžiagas. Substratinis micelis dažniausiai būna plonesnis nei orinis. Jis, kaip ir orinis, tarp rūšių skiriasi forma, spalva (žalios, juodos, rudos, geltonos atspalviai) bei storiu (2 pav.) [Anandan ir kt., 2016].



2 pav. Skirtingų aktinobakterijų izoliatų (a ir b) orinio (a,b) ir substratinio (a.1,b.1) micelio pigmentacijos skirtumai kultivuojant izoliatus Čapeko peptono agarizuotoje mitybinėje terpėje.

Nors *Streptomyces* sporos skirtos dauginimuisi, jos ilgai išlieka gyvybingos ir yra atsparios fiziniams ir cheminiams faktoriams, tačiau ne tokios atsparios kaip *Bacillus* rūšių endosporos [Barka ir kt., 2016; Flärdh ir Buttner, 2009]. *Micromonospora*, *Micropolyspora* ir *Thermoactinomyces* gentys formuoja sporas ant substratinio micelio. Sporos auga pavieniui (*Saccharomonospora*), po dvi (*Microbispora*) arba grandinėlėmis (*Streptomyces* genties), kartais sporangėse. Priklausomai nuo aktinobakterijų genties, sporų grandinėlėse gali būti nuo 2 iki 50 sporų (*Nocardia*, *Actinomadura* ir kitos gentys), o *Streptomyces* gentis yra viena iš ilgomis grandinėlėmis (iki 100 sporų) pasižyminčių genčių [Wink ir kt., 2017]. Jų forma ir paviršius (plaukuotas, lygus, grublėtas ar dygliuotas) labai svarbus atskiriant aktinobakterijų

rūšis [Barka ir kt., 2016]. Dažniausiai aktinobakterijų sporos (konidijos) būna apvalios, o kai subręsta pasižymi įvairiomis spalvomis – baltos, pilkos, rausvos ir kt.

Pigmentacija – tai melanino polimerų sintezė, taip pat būdinga ir *Actinobacteria* skyriui. Pagal išskiriamų pigmentų spalvą (rudos, oranžinės, mėlynos, žalios atspalviai ir t.t.) galima klasifikuoti aktinobakterijas į skirtingas grupes (2 pav.). Šie antriniai metabolitai ne tik padeda identifikuoti skirtingas rūšis, bet ir padeda mikroorganizmams išgyventi, nors ir nėra būtini augimui [Barka ir kt., 2016].

1.1.3. *Actinobacteria* buveinės

Daugiausia aktinobakterijų aptinkama dirvožemyje (*Streptomyces* gentis), tačiau jos yra prisitaikiusios prie įvairių kitų buveinių, tokių kaip gėlo bei sūraus vandens telkiniai ar oras. Kai kurios iš jų aptinkamos kaip augalų simbiotai endofitai – augalų ląstelių viduje (daugiausia *Frankia*, *Streptomyces*, *Nocardia* ir *Micromonospora* genčių mikroorganizmai) [Anandan ir kt., 2016]. Augalų augimą skatinančios endofitinės bakterijos sintetina fitohormonus ir sideroforus, bei tirpina fosfatus ir fiksuoja azotą, todėl veikia kaip biotrášos. Tokios *Streptomyces* genties bakterijos yra vadinamos augalų augimą skatinančiais streptomicetais (angl. *PGPS* – *plant growth promoting Streptomyces*). *Streptomyces* genčiai priklausančios bakterijos sudaro didžiąją rizosferos bakterijų dalį, gali lengvai adaptuotis prie aplinkos sąlygų ir formuoja sporas, todėl yra potencialūs biotrášų ir biokontrolės mikroorganizmai. Dėl išskiriamų medžiagų, tokių kaip antibiotikai, antihelminčiai ir antigrybeliniai antriniai metabolitai, šios aktinobakterijos apsaugo augalus nuo ligų ir parazitų (biokontrolė) mainais už maistines medžiagas. Endofitinės *Streptomyces* bakterijos taip pat veikia kaip augalų augimo skatintojai – padeda augalams pasisavinti maistines medžiagas. Augalas pritraukia rizosferinius mikroorganizmus iš šaknų išskirdamas terpenoidus ir flavonoidus bei kitas signalines medžiagas. Rizosferoje *Streptomyces* bakterijos atsiranda chemotaksio dėka, nors kol kas nežinoma dėl kokių specifinių signalinių medžiagų. Patekę į augalo šaknis, endofitiniai *Streptomyces* jas kolonizuoja ir skatina augalų augimą tirpindami fosfatus. Išskirdami ekstraląstelinius fermentus, tokius kaip celiulazės, lipazės, keratinazės, chitinazės, fitazės ir kiti, jie padeda augalams lengviau įsisavinti dirvožemio maistines medžiagas [Olanrewaju ir Babalola, 2019; Vurukonda ir kt., 2018].

1.1.4. *Actinobacteria* augimo sąlygos

Aktinobakterijos dirvožemyje gyvena kaip chemoheterotrofai saprofítai ir skaido organines medžiagas, tokias kaip organinės rūgštys, kompleksiniai polisacharidai, celiuliozė ir t.t. Dauguma jų yra aerobai ir yra priklausomos nuo įvairių augimą reguliuojančių sąlygų: pH reikšmės, aplinkos temperatūros, dirvožemio tipo, druskingumo ir drėgmės kiekio dirvoje. [Barka ir kt., 2016]. Aktinobakterijų *Streptomyces* genties atstovų augimui reikia azoto bei anglies šaltinio, deguonies ir mineralinių medžiagų, tačiau jiems nebūtinai įvairūs augimo faktoriai ir vitaminai. Šioms bakterijoms aplinkoje nereikia didelio kiekio drėgmės, tačiau dėl sporuliavimo drėgnesnėse dirvose aktinobakterijos auga geriau [Barka ir kt., 2016; Hasani ir kt., 2016].

1.1.4.1. Augimo priklausomybė nuo anglies šaltinio

Aktinobakterijos yra saprofitiniai mikroorganizmai, kurie labai svarbūs celiuliozės skaidymui ir tam sintetina fermentų kompleksus su ksilanazėmis, egzogliukanazėmis ir kitais fermentais. Jos geba skaidyti gliukozę, fruktozę, galaktozę, ramnozę, ksilozę (tyrime pasirinkti terpių anglies šaltiniai), maltozę ir kitus monosacharidus bei disacharidus, taip pat krakmolą ir celiuliozę (polisacharidus). Aktinobakterijos yra gerai prisitaikiusios prie skirtingų anglies šaltinių ir gali keisti naudojamus angliavandenių metabolinius kelius, kurių turi keletą. Angliavandenių skaidymui aktinobakterijos naudoja glikolizę, pentozės fosfatų kelią ir Krebso ciklą – procesuose naudojami įvairūs izofermentai. Kompleksinius angliavandenius padeda skaidyti išskiriami ekstraląsteliniai fermentai ir hidrolizinių fermentų kompleksai. Šių kompleksų sintezę reguliuoja katabolinės represijos sistema, priklausoma nuo aplinkoje esančio anglies šaltinio. Katabolinės represijos principu, esant gliukozei inhibuojamas kitų anglies šaltinių skaidymas. Trūkstant gliukozės, pirminiam metabolizmui naudojamos aminorūgštys. Gauti anglies monomerai naudojami formuojant vegetatyvinį substratinį micelį ir auginant aktinobakterijų biomasę. Taigi, skirtingas anglies šaltinis terpėje gali nulemti micelio augimą ir formą [Wink ir kt., 2017].

Antriam metabolizmui taip pat labai svarbus naudojamo anglies šaltinio tipas ir katabolinė represija, kad būtų naudojami energetiškai naudingiausi anglies šaltiniai. Šio metabolizmo metu dauguma aktinobakterijų gali varijuoti tarp glikolizės ir pentozės fosfatų kelio [Wink ir kt., 2017].

1.1.4.2. Augimo priklausomybė nuo pH reikšmių

Aktinobakterijų gyvavimui dirvožemyje didelės įtakos turi pH reikšmės. Šarminiam pH aktinobakterijos dažnai pradeda formuoti sporas, pH reikšmė taip pat nulemia hifų ir micelio augimą. Daugumai aktinobakterijų optimalus pH: 6,5 – 8,0. Jos jautrios rūgščiam dirvos pH, todėl dažniausiai aptinkamos šarminesnėse dirvose su didesniu kiekiu organinių medžiagų. Žemą pH geriau toleruoja kai kurios rūšys *Micromonospora* ir *Streptomyces* gentyse [Barka ir kt., 2016; Wink ir kt., 2017].

1.1.4.3. Augimo priklausomybė nuo temperatūros

Dauguma aktinobakterijų gyvena mezofiliškai, todėl didžiausias augimas pastebimas 25 °C – 30 °C temperatūroje, optimaliausia inkubacijos temperatūra – 28 °C [Anandan ir kt., 2016; Barka ir kt., 2016]. Tačiau yra aktinobakterijų, kurios išgyvena aukštesnėse temperatūrose – vadinamosios termofilinės aktinobakterijos. Tokios bakterijos auga 40 °C – 80 °C temperatūroje ir kol kas nėra plačiai ištirtos [Hussein ir kt., 2018].

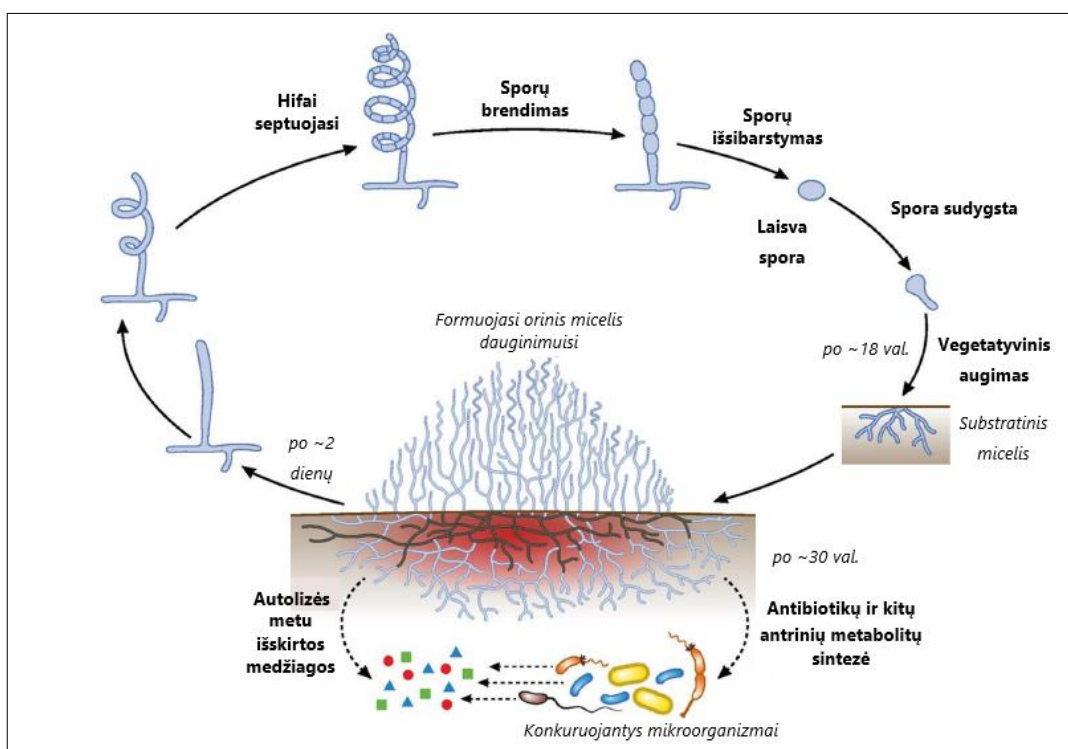
Visos minėtos sąlygos labai svarbios pramoninei biotechnologijai, nes aktinobakterijos yra vienos iš antibiotikų ir kitų antrinių metabolitų fermentacijai naudojamų producentų, todėl reikia išsiaiškinti optimaliausias jų augimo sąlygas [Wink ir kt., 2017].

1.1.5. *Streptomyces* gentis

Šiuo metu (kovas, 2020), internetinės duomenų bazės bacterio.net duomenimis, *Streptomyces* genčiai priklauso 839 rūšių, iš kurių 660 yra tinkamai paskelbtos [LPSN, 2020]. *Streptomyces* – išsamiausiai ištirta *Actinobacteria* gentis. Šių bakterijų gyvenimo ciklo tyrimai svarbūs dėl keleto priežasčių: tai viena didžiausių dirvožemio bakterijų grupių – svarbios dirvožemio anglies apytakos ciklo dalyvės [Barka ir kt., 2016]. Čia gyvenančios *Streptomyces* išskiria antrinį metabolitą geosminą, kuris suteikia dirvai būdingą kvapą. Be to, šios nejudrios bakterijos skaido krakmolą, celiuliozę, ligniną, chitiną (dėl ko yra svarbūs dirvožemio skaidytojai), kazeiną, hipoksantiną ir redukuoja nitratus į nitritus [Hasani ir kt., 2014; Juttner ir Watson, 2007]. Tai filogenetiškai plati gentis, kurios nariai labai svarbūs medicinai ir biotechnologijai, nes produkuoja pramonei naudingus antrinius metabolitus [Barka ir kt., 2016].

1.1.5.1. *Streptomyces* gyvenimo ciklas

Streptomyces genties atstovams sudėtingas gyvenimo ciklas būdingas būtent dėl micelinio augimo ir sporuliavimo. *Streptomyces* endosporų pradiniam sudygimui reikia geležies, kalcio ir magnio. Vėlesnei augimo stadijai iš aplinkos prireikia azoto ir anglies šaltinių [Wink ir kt., 2017]. *Streptomyces* sporoms patekus į tinkamas dygimui sąlygas ir sudygus, formuojasi hifai, kuriems ilgėjant formuojamas substratinis vegetatyvinis micelis. Hifai prasiskverbia į substratą išskiriamų ekstraląstelinių hidrolizinių fermentų dėka. Tokia filamentinė gyvenimo forma leidžia *Streptomyces* genties bakterijoms geriau įsitvirtinti dirvožemyje ir panaudoti rizosferos organines medžiagas [Olanrewaju ir Babalola, 2019]. Užauginus pakankamai substratinės biomasės ir aplinkos sąlygoms suprantėjus, *Streptomyces* sustabdo vegetatyvinių hifų augimą ir pradeda formuoti orinį micelį, kurio taisyklingą augimą palaiko hidrofobinis sluoksnis, būdingas tik oriniam miceliui. Tam substratinio micelio dalis sunaikinama autolizės būdu – išskirtos maistinės medžiagos panaudojamos sporų formavimui (1.1 pav.) [Wink ir kt., 2017].



1.1 pav. *Streptomyces* genties aktinobakterijų gyvenimo ciklas. Išbarstytos sporos sudygsta į substratinį micelį. Pradėjus trūkti maisto medžiagų, dalis vegetatyvinio micelio suskaidoma autolizės (užprogramuotos ląstelės žūties) būdu, o išsiskyrusios medžiagos pritraukia konkurentus. Tuo metu *Streptomyces* pradeda sintetinti antibiotikus, kurie šalina konkurentus ir leidžia panaudoti apoptozės metu išskirtas medžiagas orinio micelio susidarymui bei sporoms [van der Meij ir kt., 2017].

Orinio micelio hifai septomis atskiriami į tiesias, banguotas ar spiralės formos grandinėles – monoploidines sporų ląsteles pirmtakes [Hasani ir kt., 2014; Wink ir kt., 2017]. Kitaip nei vegetatyviniuose hifuose, šios septos susidaro reguliariais intervalais ir atskiria chromosomas po vieną [Wink ir kt., 2017]. *Streptomyces* orinio micelio sporos kaip ir filamentai yra tik apie 1 μm skersmens. Pirmtakinių ląstelių sienelės sustorėja, nukleodiniai baltymai apsaugo sporų DNR, o sporoms pilnai subrendus išskiriamas pilkas pigmentas poliketidas – *Streptomyces* konidijos prisitaiko plitimui [Flärdh ir Buttner, 2009].

1.2 *Actinobacteria* išskiriami antriniai metabolitai

Bet kurio mikroorganizmo augimui, dauginimuisi ir vystymuisi būtini metabolitai vadinami pirminiais. Antriniai metabolitai nėra būtini ar tiesiogiai susiję su šiomis funkcijomis, be to pasižymi neįprasta struktūra ir dažnai nedidele molekuline mase. Tai organiniai junginiai, kurių sintezė priklauso nuo augimo sąlygų ir nėra reguliuojama taip griežtai kaip pirminių metabolitų, todėl galimas per didelis produkcijos kiekis. *Actinobacteriaceae* šeimos bakterijos pasižymi antrinių metabolitų sintezei ypač svarbiais šešiais metaboliniais keliais: poliketidų (PKS) ir neribosominių polipeptidų (NRPS) sintazės, peptidų keliu, hibridiniu, šikimato, angliavandenių ir β-laktamo sintezės keliais [Das ir kt., 2018; Harir ir kt., 2018]. Literatūroje esama duomenų, kad auginant aktinobakterijas laboratorijoje antriniai metabolitai sintetinami ląstelėms pereinant iš eksponentinės augimo fazės į stacionariąją. Tuo metu formuojamas orinis micelis, o tam yra sunaikinama dalis substratinio vegetatyvinio micelio, kad aplinkoje atsirastų maisto medžiagų [Wink ir kt., 2017].

Tyrimais įrodyta, kad kiekvieno aktinobakterijų kamieno genai nulemia apie 10–20 antrinių metabolitų sintezę [Shaik ir kt., 2017]. Sintetinamus antrinius metabolitus galima skirstyti į keturias grupes: antagonistiniai (fungicidiniai, baktericidiniai, antivirusiniai ir junginiai prieš pirmuonis), agrobiologiniai (herbicidai, insekticidai, pesticidai), reguliaciniai (augimą skatinantys faktoriai, sideroforai, fitohormonai ir kiti) bei farmacijai svarbūs junginiai (fermentų inhibitoriai, neurologiniai ir imuninę sistemą reguliuojantys junginiai) [Harir ir kt., 2018]. Išskiriamos bioaktyvios medžiagos, ekstraląsteliniai fermentai (lipazės, ureazės, esterazės, β-gliukozidazės ir kiti) padeda suskirstyti aktinobakterijas į rūšis [Wink ir kt., 2017].

1.2.1. Antrinių metabolitų sintezei reikalingos sąlygos

Antrinių metabolitų sintezės kelias smarkiai priklauso nuo pirminio metabolizmo kelių ir prieinamų azoto bei anglies šaltinių. Būtent pirminio metabolizmo metu gaunami antrinių

metabolitų sintezės pradžia reikalingi junginiai ir molekulės [Wink ir kt., 2017]. Pramoninėje fermentacijoje į terpę papildomai pridedama antrinių metabolitų sintezei reikalingų pirmtakų – trumpųjų riebalų rūgščių ir aminorūgščių [Hasani ir kt., 2014]. Antibiotikų sintezei įtaką taip pat daro anglies ir azoto šaltiniai, aplinkos pH reikšmė (apie 7,0), temperatūra ir deguonies prieinamumas [Rafieenia, 2013].

1.2.2. Antrinių metabolitų sintezės priklausomybė nuo anglies šaltinio

Pramonėje fermentacijai pasirenkamos sunkiau apdorojamos medžiagos, t.y. polisacharidai, tokie kaip glicerolis ir krakmolai, nes su tokiu anglies šaltiniu kultūros augimas vyksta lėčiau ir todėl gaunama didesnė antibiotikų išeiga. Terpėje esant gliukozei, dėl katabolinės represijos stabdomas kitų anglies šaltinių naudojimas, sumažinamas kai kurių fermentų aktyvumas ir neišskiriama arba išskiriama mažiau antrinių metabolitų [Wink ir kt., 2017]. Tyrimais įrodyta, jog lengvai prieinami anglies šaltiniai sumažina sintetinamą nistatino, neomicino ir kitų antibiotikų kieki [Hasani ir kt., 2014; Rafieenia, 2013].

1.2.3. Antrinių metabolitų sintezės priklausomybė nuo azoto šaltinio

Aktinobakterijoms reikia azoto micelio augimui ir aminorūgščių sintezei, kurios naudojamos produkuojant antrinius metabolitus. Dažniausiai aktinobakterijos pasisavina azotą amonio jonų forma. Daugumoje atvejų, mažesnis amonio jonų kiekis ir naudojami alternatyvūs azoto šaltiniai terpėje palaiko lėtesnį micelio augimą ir todėl skatina ankstesnį antrinių metabolitų išskyrimą, panašiai kaip mažesni gliukozės kiekiai [Wink ir kt., 2017]. Kaip ir anglies, struktūriškai sudėtingesni organiniai azoto šaltiniai labiau tinka produktyvesnei antibiotikų sintezei. Tai gali būti mielių ekstraktas ar sojų miltai, kuriuos sunkiau įsisavinti nei paprastus azoto šaltinius [Hasani ir kt., 2014; Rafieenia, 2013].

1.2.4. Antrinių metabolitų sintezės priklausomybė nuo mineralinių medžiagų

Kalis, geležis, fosforas, cinkas ir kiti elementai terpėje padidina antibiotikų išeigą. Pastebėta tai, kad terpėje pasibaigus būtent fosforui, prasideda antibiotikų sintezė. Be to, sintezę skatina ir vario, geležies ar mangano divalenčiai jonai [Martin, 2004; Hasani ir kt., 2014].

1.3. *Actinobacteria* sintetinami antibiotikai

Natūralius antibiotikus sintetina įvairios bakterijos ir mikroskopiniai grybai, tačiau tik 1 % tų medžiagų yra panaudojamos medicinoje. Dauguma natūraliųjų medžiagų laboratorijose „patobulinamos“ ir taip gaunami pusiau sintetiniai antibiotikai [Harir ir kt., 2018]. Net 90 % komerciškai naudojamų antibiotikų buvo sukurti iš *Actinobacteria* išskiriamų antrinių metabolitų [Das ir kt., 2018]. Aktinobakterijų sintetinami antibiotikai skirstomi į pagrindines antibiotikų klases: makrolidai (klaritromicinas, eritromicinas), tetraciklinai, aminoglikozidai (neomicinas, gentamicinas, streptomicinas), ansamicinai, antraciklinai ir β-laktamai (penicilinai, cefalosporinai, karbapenemai) [Harir ir kt., 2018].

1.3.1. Skirtingų *Actinobacteria* genčių sintetinami antibiotikai ir jų panaudojimas

Antibiotikai – svarbiausi *Streptomyces* genties bakterijų antriniai metabolitai (1.3 lentelė). Būtent iš šios genties mikroorganizmų gauti tokie vaistai kaip ivermektinas, streptomicinas, nistatinas ir kt. [Das ir kt., 2018; Harir ir kt., 2018]. *Streptomyces* spp. sintetina makrolidus, kurie paveikia bakterijų ribosomas ir stabdo jų augimą, pvz. eritromiciną. Nistatinas – dar vienas antibiotikas fungicidas iš makrolidų klasės, sintetinamas *S. noursei*. Jis pasižymi glikozidine struktūra ir slopina *Candida albicans* augimą. [Solecka ir kt., 2012].

Medicinoje naudojamiems antibiotikams β-laktamams ir kitiems atsparumą įgavęs *Staphylococcus aureus* vadinamas meticilinui atspariu auksiniu stafilokoku, MASA (angl. MRSA – *methicillin resistant Staphylococcus aureus*). Tai vadinamųjų hospitalinių infekcijų sukėlėjas – antrinių infekcijų, dažniausiai pasitaikančių nusilpusio imuniteto, senyvo amžiaus ligoniams [Kemung ir kt., 2018]. Šiuo metu, vienas iš prieš MASA naudojamų antibiotikų yra daptomicinas, sintetinamas *Streptomyces* genties bakterijų [Frankenfeld ir kt., 2018]. Jis veikia prieš vankomicinui ir meticilinui atsparią *S. aureus*, penicilinui atsparią *S. pneumoniae*, bei kitas „superbug bakterijas“, prisirišdamas prie ląstelės membranos ir ją depoliarizuodamas bei keisdamas jonų koncentracijas ląstelėje [Solecka ir kt., 2012]. 2003 metais jis buvo patvirtintas JAV maisto ir vaistų administracijos (angl. FDA – *Food and drug administration*) kaip saugus naudoti prieš *Staphylococcus aureus* sukeltą kraujo užkrėtimą ir kai kurių Gram-teigiamų bakterijų sukeltas odos ligas. O nuo 2006 metų, daptomicinas pradėtas naudoti prieš meticilinui jautrių ir atsparių *S. aureus* kamienų sukeltą endokarditą [Frankenfeld ir kt., 2018].

Toliau tęsiama MASA veikiančių antrinių metabolitų paieška parodė virš 100 naujų antagonistinių junginių. Šie junginiai, tokie kaip streptorubinas B, naikina bioplėveles ir leidžia

antibiotikams bei imuninei sistemai pasiekti *S. aureus*. Tokius antrinius metabolitus sintetinantys *Streptomyces* auga endofitiškai, dirvožemyje bei vandens sistemose. Išanalizavus šių bioaktyvių medžiagų struktūrą, jas galima skirstyti į poliketidus, neribosominius peptidus, alkaloidus bei hibridinius junginius. Dėl pagrindinių antrinių metabolitų sintezės kelių (neribosominių peptidų ir poliketidų kelių), daugiausia tokių medžiagų priklauso būtent poliketidų klasei, pvz. poliketomicinas, kuris pasižymi ir antagonistiškumu prieš vėžinius auglius [Kemung ir kt., 2018].

1.3 lentelė. Kai kurios *Streptomyces* sp. kamienų sintetintos antimikrobinės medžiagos ir jų paskirtis [Harir ir kt., 2018; Hasani ir kt., 2014].

Antibiotikai	<i>Streptomyces</i> kamienas	Paskirtis
Amfotericinas B	<i>S. nodosus</i>	Fungicidinė
Avermektinas	<i>S. avermitilis</i>	Antiparazitinė
Cefalosporinas	<i>S. clavuligerus</i>	Baktericidinė
Chloramfenikolis	<i>S. venezuelae</i>	Baktericidinė, inhibuoja baltymų sintezę
Daptomicinas	<i>S. roseosporus</i>	Baktericidinė
Eritromicinas	<i>S. erythreus</i>	Baktericidinė
Neomicinas	<i>S. fradiae</i>	Baktericidinė
Nikomycininas	<i>S. tendae</i> , <i>S. ansochromogenes</i>	Fungicidinė
Nistatinas	<i>S. noursei</i>	Fungicidinė, prieš <i>C. albicans</i>
Poliketomicinas	<i>S. diastatochromogenes</i> , <i>Streptomyces</i> sp.	Baktericidinė, citotoksinė
Rapamicinas	<i>S. hygroscopicus</i>	Baktericidinė, imunosupresinė, prieš vėžinę
Streptomycininas	<i>S. spectabilis</i>	Antimikrobinė
Tetraciklinas	<i>S. viridifaciens</i> , <i>S. rimosus</i>	Antimikrobinė
Vankomicinas	<i>S. orientalis</i>	Antimikrobinė, baktericidinė

Micromonospora – antra iš didžiausių antibiotikus sintetinančių *Actinobacteria* genčių, nors ir nėra daug ištirta. Kaip ir *Streptomyces*, šie mikroorganizmai – svarbūs dirvožemio organinių medžiagų skaidytojai, išskiriantys hidrolizinius fermentus. Be to, jie puikūs bioapsauginiai mikroorganizmai, aktyvuojantys augalų gynybines sistemas prieš patogenus. Trečioji biologiškai aktyvias medžiagas išskirianti gentis – *Nocardia* [Barka ir kt., 2016]. Šių trijų genčių mikroorganizmų, bei *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis* ir *Actinoplanes* sintetinami fermentai, antibiotikai ir kiti antriniai metabolitai – labai svarbūs pramoninei biotechnologijai [Solecka ir kt., 2012].

1.4. *Streptomyces* sintetintos kitos bioaktyvios medžiagos

Streptomyces gentis, didžiausia *Actinobacteria* skyriuje, žinoma bioaktyvių antrinių metabolitų sinteze: baktericidiniais, antioksidaciniais, fungicidiniais, hipocholesteroleminiais

ir priešvėžiniais junginiais. *Streptomyces* sintetiniams antriniams metabolitams būdinga įvairi cheminė struktūra ir aktyvumas. Iš visų antimikrobinių medžiagų, apie 34 % veikia prieš mikroskopinius grybus, iš jų apie 21 % – prieš mieles [Solecka ir kt., 2012].

1.4.1. *Streptomyces* sintetinami fungicidai ir jų panaudojimas

1955 metais atrastas *S. nodosus* išskiriamas makrolidas amfotericinas B – vienas iš daugiausiai ištirtų *Streptomyces* antrinių metabolitų [Trejo ir Bennett, 1962]. Šis polieninis makrolidas veikia grybų ir mikoplazmų sienelės sudėtinę dalį ergosterolį ir padidina ląstelės pralaidumą, sukeldamas kalio jonų praradimą. Nors žmonių ląstelės ergosterolio neturi, amfotericinas B taip pat rišasi prie stearinų, todėl fungicidas turi pašalinį poveikį. Tai yra plataus veikimo antagonistinis junginys, tačiau dėl toksiškumo jį sunku panaudoti medicinoje ir jis daugiausiai naudojamas išorinėms odos infekcijoms gydyti [Wink ir kt., 2017]. Panašiai kaip amfotericinas B veikiantis nistatinas – dar vienas medicinoje vartojamas antigrybinis junginys. Šis *S. noursei* išskiriamas fungicidas naudojamas įvairiose laboratorijose ir profilaktiškai prieš nusilpusio imuniteto pacientų grybines infekcijas [Wink ir kt., 2017].

Grybų sienelės chitino sintezę stabdo fungicidiniai nukleozidai nikomicinai ir polioksinai. Polioksinai veikia prieš fitopatogeninius grybus, o nikomicinai, sintetinami *S. ansochromogenes*, geriau veikia prieš *Candida albicans* [Solecka ir kt., 2012]. Tiriant vieną iš endofitinių *Streptomyces* kamienų TK-VL_333, atrastas išskiriamos 1-*H*-indolo-3-karboksilinės rūgšties fungicidinis aktyvumas prieš *Candida albicans*, *Aspergillus niger* ir *Fusarium oxysporum* [Taechowisan ir kt., 2005]. Kitas *Streptomyces hygroscopicus* antrinis metabolitas – rapamicinas, pasižymi antagonistiniu poveikiu prieš *C. albicans*. Prieš kai kurių tipų kandidozę jis veikia net geriau nei amfotericinas B. Atrasta, kad rapamicinas arba kitaip sirolimas, stipriai veikia prieš piktybinius auglius ir kaip imunosupresantas [Solecka ir kt., 2012; Sehgal, 2003].

1.4.2. *Streptomyces* sintetinami fermentai ir jų panaudojimas

Fermentai, tokie kaip proteazės, celiulazės, pektinazės, lipazės ir kiti yra vieni svarbiausių *Streptomyces* išskiriamų antrinių metabolitų. *Streptomyces* sintetinami fermentai naudojami farmacijoje, bioremediacijoje, tekstilės pramonėje, maisto biotechnologijoje ir kitose srityse (1.4 lentelė) [Harir ir kt., 2018].

1.4 lentelė. Kai kurie *Streptomyces* spp. kamienų sintetinami fermentai ir jų pritaikymas pramonėje [Harir ir kt., 2018; Anandan ir kt., 2016].

Fermentas	<i>Streptomyces</i> kamienas	Paskirtis	Pramonės sritis
Aminoacilazė	<i>S. olivaceus</i> , <i>S. sparsogenes</i>	Cefalosporinų ir pusiau dirbtinų penicilinų gamyba	Farmacija
Celiulazė	<i>S. halotolerans</i>	Audinio minkštinimas, džinsinio audinio apdorojimas	Tekstilė
	<i>S. ruber</i> , <i>Streptomyces</i> sp.	Rašalo pašalinimas (popieriaus perdirbimas), pluošto perdarymas	Popieriaus ir medienos pramonė
Chitinazė	<i>S. griseus</i>	Chitino žaliavų apdorojimas	Bioremediacija
Lipazė		Medžiagų išvalymas	Tekstilė
		Tešlos stabilizatorius	Maisto pramonė
		Dėmių išvalymas	Tekstilė
		Sūrio skonio priedas	Pieno pramonė
<i>N</i> -acetilmuramidazė	<i>S. globisporus</i>	Bakteriostatinis fermentas	Laboratoriniai tyrimai
Neuraminidazė	<i>Streptomyces</i> sp.	Klinikiniai ir ląstelės morfologiniai tyrimai	Medicinos tyrimai
Pektinazė	<i>S. lydicus</i>	Gėrimų gryninimas, maišymas	Maisto pramonė
Proteazė	<i>Streptomyces</i> sp.	Kraujo krešulių išvalymas	Medicina
	<i>S. pactum</i> , <i>S. thermoviolaceus</i>	Sūrio gamyba, alaus skaidrinimas, mažiau kalorijų turintis alus	Maisto pramonė

Streptomyces spp. išskiriami hidroliziniai fermentai veikia antagonistiskai prieš grybinius patogenus, tokius kaip *Fusarium oxysporum* ir *Sclerotinia minor*. Šie ekstraląsteliniai fermentai (β -1,3-gliukanazė ir chitinazė) lizuoja grybų sienelės komponentus [Solecka ir kt., 2012].

1.4.3. *Streptomyces* sintetintos paviršiaus aktyviosios medžiagos ir jų panaudojimas

Tai mikroorganizmų sintetinami mažos molekulinės masės antriniai metabolitai, kurie turi hidrofobinę ir hidrofilinę dalis bei dažniausiai yra išskiriami į terpę *Streptomyces* augant su hidrofobiniais anglies šaltiniais. Šie antriniai metabolitai plačiai naudojami farmacijos, kosmetikos, tekstilės ir kitose srityse kaip alternatyva cheminiams ir naftos produktams. Taip pat gilinamasi į paviršiaus aktyviųjų medžiagų (biosurfaktantų) antimikrobinį aktyvumą – pvz. lipopeptidinį daptomiciną ir polimiksiną B, kurie naudojami medicinoje kovojant atitinkamai su Gram-teigiamų ir Gram-neigiamų bakterijų infekcijomis [Harir ir kt., 2018; Henkel ir Hausmann, 2019]

1.4.4. *Streptomyces* sintetinami vitaminai ir jų panaudojimas

Aktinobakterijos gali sintetinti ir kofaktorių vitaminą B12 (kobalaminą) – itin svarbų ląstelių cheminėms reakcijoms. Šis junginys sintetinamas tik kai kurių bakterijų, mikroskopinių grybų ir archėjų, taigi, žmonės gauna šį junginį per suvalgytą maistą ir iš virškinamojo trakto komensalų [Antony, 2018]. Kobalaminas labai svarbus eritrocitų brendimui kaulų čiulpuose, neuronų mielino dangalo bei DNR sintezei [Graf ir kt., 2013]. Norint išgauti vitaminą B12, aktinobakterijų terpėje turi būti nedidelis kiekis kobalto druskų. Šios druskos taip pat aktyvina griseino ir streptomicino išskyrimą [Harir ir kt., 2018]

1.4.5. *Streptomyces* sintetinami pigmentai

Streptomyces sintetinami pigmentai skirstomi į endo ir egzopigmentus. Pirmieji prisiriša prie mikroorganizmo ląstelių, o antrieji – išskiriami į aplinką, t.y. terpę. Manoma, kad jie formuojami dėl apsauginės funkcijos, pvz. apsaugai nuo UV spindulių. Kai kurie antibiotikai taip pat yra laikomi pigmentais. Jų cheminė struktūra nėra pilnai ištirta, nes pigmentų sintezė priklauso nuo anglies ir azoto šaltinių terpėje, pH reikšmių bei aplinkos temperatūros [Anandan ir kt., 2016].

1.4.6. *Streptomyces* sintetinami antioksidantai ir jų panaudojimas

Šių dienų tyrimai ieško saugių ir natūralių medicinai naudingų antrinių metabolitų, tokių kaip antioksidantai. Dėl to tiriamas *Streptomyces* bakterijų augimas oksidacinio streso metu ir išskiriami antioksidantai [Janardhan ir kt., 2014]. Aerobinio metabolizmo metu išsiskyrus per dideliam kiekiui reaktyviųjų deguonies formų (angl. *reactive oxygen species*), jos sukelia ląstelėms oksidacinį stresą ir formuoja laisvuosius radikalus. Tai dažniausiai siejama su diabetu, vėžiu, neurodegeneratyvinėmis ir kitomis žmonių ligomis. Organizme esant nepakankamai pajėgioms antioksidacinėms sistemoms, prireikia būtent *Streptomyces* sintetinamų metabolitų [Siddhart ir kt., 2020].

1.5 Grybinės ligos sukeliančios mielės

Grybinės ligos daugiausia paveikia nusilpusio imuniteto žmones, o infekcijas sukeliantys mikroskopiniai grybai laikomi oportunistiniais patogenais. Grybų sukeliamos ligos

dažniausiai nėra ypač pavojingos sveikatai, jei yra laiku nustatomos, tačiau blogiausiu atveju visame kūne išplitusios sisteminės infekcijos gali baigtis mirtimi. Šiais laikais, padaugėjus nusilpusio imuniteto AIDS pacientų ir organų transplantacijos recipientų, bei medicinoje vartojant daugiau plataus spektro antibiotikų, grybinių ligų procentas išaugo [Pérez-Torrado ir Querol, 2016].

1.5.1. *Candida* gentis

Candida genties mielės – komensaliniai mikroorganizmai, nusilpusio imuniteto žmonėms sukeliantys gleivinės ir gilesnių audinių infekcijas. Pagrindinė šių mielių virulentiškumo ir atsparumo fungicidinėms medžiagoms priežastis, sukelianti būdingas ligas, yra bioplėvelių formavimas. Tai padeda patogeniniams kamienams išvengti žmogaus imuninės sistemos atsako ir vartojamų antigrybinių medžiagų. Be to, *Candida* mielės turi pažengusius adhezijos mechanizmus ir išskiria hidrolizines fosfolipazes, proteazes ir hemolizinus, ardančius pacientų audinius [Sardi ir kt., 2013].

1.5.1.1. *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis – įprastas žmogaus odos (dažniausiai rankų odos) komensalas, taip pat randamas dirvožemyje, vandens šaltiniuose, bei naminiuose gyvūnuose. *C. parapsilosis* auga ant Sabūro agaro, baltomis, blizgiomis, kreminės konsistencijos kolonijomis. Šių mielių ląstelės yra apvalios arba ovalios, kartais cilindro formos. Šios mielės nėra obligatiniai patogenai, tačiau gali sukelti pavojingas hospitalines infekcijas nusilpusio imuniteto pacientams operacijų metu ir formuodamos bioplėveles ant kateterių bei implantų [Trofa ir kt., 2008]. Bioplėvelės padeda grybiniams patogenams išvengti imuninės sistemos ir antimikrobinių medžiagų poveikio, todėl tokias infekcijas sunku gydyti. Patogeninių mielių bioplėvelės yra priklausomos nuo deguonies kiekio, pH reikšmės ir mielių kamieno, bei pasižymi skirtingais fosforo, angliavandenių, heksozaminų ir baltymų kiekiais. Lyginant su kitomis *Candida* mielėmis, *C. parapsilosis* bioplėvelės pasižymi dideliu angliavandenių ir mažesniu baltymų kiekiu [Sardi ir kt., 2013].

Ligoninėse, *C. parapsilosis* gali sukelti grybines ligas naujagimiams, ypač neišnešiotiems ir laikomiems intensyvios priežiūros skyriuose. Panašiai kaip *C. albicans*, *C. parapsilosis* geba sukelti endokarditą bei kraujo užkrėtimą, akies audinių, sąnarių ir pilvaplėvės uždegimus [Sardi ir kt., 2013; Trofa ir kt., 2008]. Vystantis mikroorganizmų atsparumui, antigrybinių medžiagų kartais nepakanka ir tenka pašalinti ir pakeisti pažeistus

kateterius ar implantus – tai sukelia dar didesnę riziką naujoms infekcijoms atsirasti operacijų metu [Sardi ir kt., 2013].

1.5.1.2. *Candida albicans*

C. albicans – tai įprastas virškinamojo trakto, burnos ir makšties gleivinės komensalas [Escalante-Rendiz ir kt., 2019]. Taip pat, tai dažniausiai pasitaikantis oportunistinis grybinis patogenas bei pagrindinis *Candida* genties patogenas, sukeliantis kandidozes [Charousová ir kt., 2016]. Dažniausiai, infekcijos perduodamos endogeniškai – t.y., nusilpus šeimininko imunitetui ar patekus į kitą organizmo vietą, komensalinės *Candida* rūšys pradeda elgtis patogeniškai. Egzogeniškai infekcijos prasideda dėl užkrėstų kateterių ir implantų, bei dėl gydytojų kontakto su pacientais. Ligos gali būti skirstomos į gilumines (kraujo užkrėtimas, kandidozės) ir paviršines (gleivinės ir odos) [Sardi ir kt., 2013]. Dėl diabeto, ŽIV, chemoterapijos ar plataus spektro antibiotikų vartojimo nusilpusio imuniteto pacientus dažnai paveikia burnos gleivinės kandidozė ir dantenų uždegimas [Ashbee ir Bignell, 2010].

Šiuo metu, prieš *C. albicans* bioplėveles kovojama su flukonazoliu ir kaspofunginu (echinokandinų klasė), tačiau tokias infekcijas išgydyti labai sunku ir paveikti implantai ar kateteriai turi būti pašalinti, kaip ir gydant *C. parapsilosis* ligas [Ashbee ir Bignell, 2010; Sardi ir kt., 2013]. *Streptomyces* sp. bakterijų išskiriami polienai amfotericinas B ir nistatinas taip pat naudojami *C. albicans* ligoms gydyti. Šie junginiai rišasi prie grybinės sienelės ergosterolio ir sudaro joje poras, sukeldami ląstelės žūtį. Tačiau, laikui bėgant išsivysto polienams atsparūs *C. albicans* kamienai, sienelėje turintys mažesnę ergosterolio kiekį. Ir nors amfotericinui B patogeniniai mikroorganizmai didesnio atsparumo kol kas neįgavo, jis pasižymi toksiškumu ir nepageidaujamais efektais [Spampinato ir Leonardi, 2013]. Didėjant patogenų atsparumui, ieškoma naujų platesnio spektro, netoksiškų ir nebrangių bioaktyvių antigrybinių junginių, nes esami preparatai turi pašalinių efektų [Escalante-Rendiz ir kt., 2019].

1.5.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces genties mielės žinomos kaip maisto pramonės mikroorganizmai, naudojami vyno ir alaus fermentacijoje. Neseniai šios mielės pradėtos naudoti kaip maisto papildai bei probiotikai padedant kovoti su antibiotikų vartojimo sukeltu viduriavimu ir yra aptinkamos virškinimo trakte kaip komensaliniai mikroorganizmai [Ashbee ir Bignell, 2010]. *S. cerevisiae* yra laikoma „GRAS“ mikroorganizmu (pripažintu saugiu vartojimui, angl. –

„generally regarded as safe“), todėl galimas neigiamas šių mielių poveikis nėra pilnai ištirtas. Vis dėlto, *S. cerevisiae* virulentiškumo tyrimai labai svarbūs, nes per keletą pastarųjų dešimtmečių *S. cerevisiae* infekcijų padaugėjo, be to, šių mielių maisto papildai ir produktai padeda joms lengvai patekti į organizmo vidų [Pérez-Torrado ir Querol, 2016]. Nors *S. cerevisiae* gali būti laikoma oportunistiniu patogenu, nes infekcijos kyla tik nusilpusio imuniteto pacientams operacijų metu, retu atveju grybo sukeltas kraujo užkrėtimas pasireiškia ir pacientams, turintiems stiprų imunitetą [Ashbee ir Bignell, 2010; Llopis ir kt., 2014].

Iš *Saccharomyces* genties mielių, daugiausia infekcijų žmogui sukelia būtent *S. cerevisiae*. Ši rūšis laikoma nusilpusio imuniteto pacientų endokardito, peritonito, osteomielito, odos audinių, grybinio kraujo užkrėtimo ir pūlinių priežastimi. Vis dėlto, palyginus su bakteriniais ir kitais grybiniais patogenais, šios mielės nėra laikomos ypač pavojingomis [Enache-Angoulvant ir Hennequin, 2005; Pérez-Torrado ir Querol, 2016].

Šios mielės kultivuojamos Sabūro agaro terpėje, auga 35 °C – 37 °C temperatūroje baltomis kreminės konsistencijos kolonijomis. Dauguma *S. cerevisiae* kamienų jautrūs flucitozinui ir amfotericinui B, kaip ir *C. albicans* [Ashbee ir Bignell, 2010].

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Terpės

Čapeko – peptono agaras (ČPA): naudotas gryninant ir kultivuojant aktinobakterijų izoliatus, pH 7,3 [Atlas, 2010].

Sacharozė – 30 g/l

Peptonas – 5 g/l

NaNO₃ – 3,0 g/l

K₂HPO₄ – 1,0 g/l

MgSO₄ · 7H₂O – 0,5 g/l

KCl – 0,5 g/l

FeSO₄ – 0,01 g/l

Agaras – (20 – 25) g/l

Distiliuotas vanduo – 1,0 l

Mineralinis agaras (MA): naudotas aktinobakterijų izoliatų gryninimui bei terpės su skirtingais anglies šaltiniais poveikiui išskiriamoms medžiagoms tirti [Gauze ir kt., 1983].

Anglies šaltinis – 20 g/l

K₂HPO₄ – 0,5 g/l

MgSO₄ · 7H₂O – 0,5 g/l

KNO₃ – 1 g/l

NaCl – 0,5 g/l

FeSO₄ – 0,01 g/l

Agaras – 30 g/l

Distiliuotas vanduo – 1,0 l

Anglies šaltiniai, naudoti tyrime: D-gliukozė, D-galaktozė, D-fruktozė, D-ksilozė, L-ramnozė, laktozė.

Mielių ekstrakto-peptono-dekstrozės terpė (YEPD): naudota tiriant aktinobakterijų išskiriamų medžiagų inhibuojančias savybes prieš skirtingus mielių kamienus, pH 4,8 [Naumova ir Naumov, 1973].

Gliukozė – 40 g/l

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – 35 g/l

Peptonas – 5 g/l

Mielių ekstraktas – 5 g/l

Citrinos rūgštis – 10,5 g/l

Agaras – 20 g/l

Distiliuotas vanduo – 1,0 l

Terpės pH reikšmė reguliuojama koncentruotos citrinos rūgšties arba natrio fosfato tirpalais.

Sabūro dekstrozės agaras (SDA): naudotas kultivuojant tiriamas mieles, pH 5,6 [Atlas, 2010].

Dekstrozė – 40 g/l

Peptonas – 10 g/l

Agaras – 15 g/l

Distiliuotas vanduo – 1,0 l

2.2.1. Aktinobakterijų izoliatai

Darbe naudoti atsitiktiniu būdu pasirinkti 99 aktinobakterijų izoliatai, esantys Gamtos tyrimų centro Biodestruktorių laboratorijos kolekcijoje. Detaliau pateikiama 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Darbe naudoti aktinobakterijų izoliatai. Paryškintu šriftu išskirti bioaktyvūs aktinobakterijų izoliatai.

Aktinobakterijų izoliatas	Išskyrimo substratas
107JR, 112JR, 114JR, 138JR, 144JR, 160JR, 169JR, 192JR, 197.2JR, 213JR, 216JR, 217JR.	Įvairios polimerinės medžiagos, Juodkrantė
5.1-2c, 5.3g, 5.4c, 5.4d , 5.4h, 5Mb, 7Mb , 8.1 c, 8.2b, 8 org b, 8 org c, 8Mb, 8M(C), 1OH , 1M (A,B,C,D), 3M (A,B), 4OH (A), 5OH(A) , 5OH.C, 5OH.D, 5M (A,B), 6OH (A,B), 7OH (B), 7OH (C), 7M (A,B), 8 OH (B), 8M (A, D).	Dirvožemis, Vilniaus rajonas
L.M.b	Vabzdžių žarnynas
1) A,B,C,D,F,G,H,I,J, K,L , 2) A,B,C,E,F,H, 3) A,B,C,D, 7) A,B,C,D,E,F,I, 8) A,B,E,F,G,H, 9) A,B,D, 10) C,D,E, 11) B, 12) A,B1,B2 ,C,D, 13) F,G,H,I,J.	Dirvožemis, Alytaus rajonas

2.2.2. Mielių kamienai

Darbe buvo naudojami mielių kamienai, esantys Gamtos tyrimų centro Biodestruktorių tyrimų laboratorijos kolekcijoje:

Toksinams jautrus kamienas *S. cerevisiae* α '1 (MAT α , leu2-2 [Kil-0]) [Čitavičius, Inge–Večtomov, 1972];

Candida albicans CBS 2730;

Candida parapsilosis CBS 8836;

Saccharomyces cerevisiae C100 645.

2.3. Reagentai

Darbe naudoti reagentai pateikiami 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Naudoti reagentai ir cheminės medžiagos, bei jų gamintojai.

Reagentas	Gamintojas
D-fruktozė	LACHEMA, Čekija
L-ramnozė	CHEMAPOL, Čekija
Laktozė	OXOID LTD., Didžioji Britanija
D-sacharozė	Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija
D-galaktozė	REACHIM, Rusija
D-ksilozė	Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija
D-gliukozė	Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija
Natrio nitratas	PENTA, Čekija
Kalio nitratas	Merck, Vokietija
Kalio chloridas	LACHEMA, Čekija
Dikalio fosfatas	LACHEMA, Čekija
Magnio sulfato heptahidratas	LACHEMA, Čekija
Natrio chloridas	Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija
Geležies (II) sulfato heptahidratas	PENTA, Čekija
Peptonas	Liofilchem, Italija
Agaras	Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija
Mielių ekstraktas	DIFCO LABORATORIES, JAV
Citrinos rūgštis	POLSKIE ODCZYNNIKI CHEMICZNE S.A., Lenkija
Dinatrio fosfato dodekahidratas	Lach – Ner, Čekija

2.4. Prietaisai

Darbe naudoti prietaisai pateikiami 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. Naudoti prietaisai ir jų gamintojai.

Prietaisas	Gamintojas
Autoklavas „BENCHTOP AUTOCLAVE 5075 EL-D“	Tuttnauer, Nyderlandai
Laminarinis boksas „Safemate 1.2 vision“	BIOAIR, Italija
Termostatas „Incucell 55“	BMT, JAV
Purtyklė „IKA KS 501 digital“	IKA Werde GmbH & co AG, Vokietija
Svarstyklės „VIBRA DJ-600P“	SHINKO DENSHI, Japonija
Spektrofotometras „EVOLUTION 60S“	Thermo Electron Scientific Instruments LLC, JAV
pH-metras „IQ 155“	IQ Scientific Instruments, JAV

2.5. Tyrimo metodai

2.5.1. Aktinobakterijų izoliatų gryninimas ir kultivavimas

Prieš pradedant biologiškai aktyvių medžiagų paieškos bandymus aktinobakterijų izoliatai buvo sėjami štrichavimo būdu ant ČPA mitybinės terpės, norint patikrinti ar visos kultūros yra gyvybingos ir grynos. Lėkštelės su pasėliais inkubuojamos $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 7 dienas. Išaugę ir grynai aktinobakterijų izoliatai sėjami į mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai laikomi termostate $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 7 dienas. Vėliau perkeliama laikymui į šaldytuvą, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

2.5.2. Biologiškai aktyvių aktinobakterijų izoliatų paieška

Atsitiktiniu būdu pasirinktų aktinobakterijų izoliatų gebėjimas išskirti biologiškai aktyvias medžiagas pirmiausia buvo tikrinamas ant jautraus *S. cerevisiae* α' 1 kamieno. Šis kamienas yra jautrus visų tipų toksinams. *S. cerevisiae* α' 1 bandymams auginama ant Sabūro deksrozės agaro 48 val., $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Pagaminama YEPD terpė, pH 4,8. Ji plonu sluoksniu išpilstoma steriliose Petri lėkštelėse. Tokiu būdu paruošiamas mitybinės terpės pagrindas. Tuo tarpu paruošiama *S. cerevisiae* α' 1 mielių suspensija, kilpele paskirstant ląsteles steriliame distiliuotame vandenyje. Purtykle supurtytos suspensijos optinis tankis matuojamas spektrofotometru EVOLUTION 60S esant 530 nm bangos ilgiui. Mielių suspensijos optinio tankio ribos turi būti nuo 0,12 iki 0,15, tai atitinka 10^6 ląstelių 1 mililitre vandens. Suspensija automatine pipete išpilstoma į mėgintuvėlius po 1 ml. Į šiuos mėgintuvėlius su mielių suspensija pilama po 9 ml atvėsintos YEPD terpės ir gautas mišinys pilamas ant sustingusios terpės sluoksnio Petri lėkštelėse.

Tokiu pačiu būdu ruošiamos Petri lėkštelės tyrimams su kitomis mielių rūšimis. Taško ir diskų metodu užnešami tiriami aktinobakterijų izoliatai ir tokios lėkštelės inkubuojamos 48 valandas $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Tuomet stebimos ir matuojamos susidariusios skaidrios inhibicinės zonos.

2.5.3. Biologiškai aktyvių aktinobakterijų izoliatų kultivavimas ant skirtingų anglių šaltinių

Gryni bioaktyvūs aktinobakterijų izoliatai kilpele štrichavimo būdu sėjami ant mineralinio agaro su skirtingais anglių šaltiniais: D-gliukozės, D-galaktozės, D-fruktozės, D-ksilozės, laktozės ir L-ramnozės. Šios lėkštelės inkubuojamos $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 7 dienas ir naudojamos tolimesniuose tyrimuose.

2.5.4. Aktinobakterijų izoliatų augimo ir biologinio aktyvumo priklausomybė nuo skirtingos terpės pH reikšmės

Paruošiamos mineralinio agaro (anglių šaltinis – gliukozė) terpės su skirtingomis pH reikšmėmis – pH 5 ir pH 6. Terpės pH reguliuojamas 10 N HCl ir tikrinamas pH-metru. Ant skirtingų pH reikšmių terpių štrichavimo būdu sėjami bioaktyvūs aktinobakterijų izoliatai. Aktinobakterijų izoliatų antagonistinis aktyvumas tikrinamas tokiais pačiais būdais, kaip ir auginus skirtingų anglių šaltinių mitybinėje terpėje.

2.5.5. Aktinobakterijų izoliatų biologinio aktyvumo tyrimas skirtingais metodais

Aktinobakterijų izoliatų biologinis aktyvumas buvo tiriamas taško ir diskų metodais. Iš aukščiau minėtų (2.5.3 bei 2.5.4 skyreliuose) išaugusių aktinobakterijų izoliatų su skirtingais anglių šaltiniais ir pH reikšmėmis, mikrobiologine kilpele paimamas aktinobakterijų izoliato mėginys ir uždedamas ant paruoštos YEPD terpės su tiriamu mielių kamieniu (taško metodas).

Laboratoriniu grąžteliu išpjauamas 7 mm skersmens diskas su terpe ir aktinobakterijų izoliatu bei dedant ant terpės su tiriamomis mielėmis paviršiaus apverčiamas (diskų metodas).

Petri lėkštelės su aktinobakterijų izoliatais inkubuojamos termostate 2 dienas $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po dviejų dienų matuojamos lėkštelėse susidariusios inhibicinės zonos.

2.5.6. Statistinis duomenų apdorojimas

Inhibicinių zonų dydis buvo matuojamas liniuote (centimetrais) imant du zonos skersmenis ir išvedant jų vidurkį (paklaida laikoma $\pm 0,1$ cm). Pagal šios zonos dydį sprendžiama apie testuojamų izoliatų antagonistinį aktyvumą prieš patogenines mieles.

Gauti matmenų vidurkiai suvesti į lenteles su Microsoft Excel programa, iš lentelių gaunami aktyviausių aktinobakterijų izoliatų grafikai.

3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Kaip jau minėta, pagrindinis šio darbo tikslas buvo kultivuoti biologiškai aktyvias medžiagas produkuojančius aktinobakterijų izoliatus mitybinėje terpėje su skirtingais anglies šaltiniais bei skirtingose pH reikšmėse, ir įvertinti, kaip išskiriamos medžiagos paveikia patogenines mieles.

3.1.1 Biologiškai aktyvias medžiagas produkuojančių aktinobakterijų paieška

Atlikus aktinobakterijų izoliatų gebėjimo produkuoti biologiškai aktyvias medžiagas ant *S. cerevisiae* α '1 kamieno tyrimus nustatyta, kad ne visi izoliatai išskiria aktyvias medžiagas (1 priedas, 3.1.1. lentelė).

Iš atsitiktiniu būdu pasirinktų 99 aktinobakterijų izoliatų buvo atrinkta tik 19 bioaktyvių (tik apie 19 % visų tiriamų izoliatų pasižymėjo bioaktyvumu).

3.1.2 Biologiškai aktyvias medžiagas produkuojančių aktinobakterijų gebėjimo augti su skirtingais anglies šaltiniais vertinimas

Biologiškai aktyvūs aktinobakterijų izoliatai buvo kultivuojami mitybinėse terpėse su skirtingais anglies šaltiniais (3.1.2 lentelė).

Kultivuojant bioaktyvius aktinobakterijų izoliatus mitybinėje terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, buvo pastebėta, kad 7Mb ir 5.4c izoliatai neaugo D-ksilozės terpėje, o 8M(C), 5OH ir 192JR izoliatai neaugo D-fruktozės bei D-ksilozės terpėse. 12.B.1 aktinobakterijų izoliatas neaugo D-fruktozės, D-galaktozės ir D-ksilozės terpėse, o 12.B.2 ir 160JR izoliatai – D-fruktozės ir D-galaktozės terpėse. 107JR izoliatas neaugo D-fruktozės terpėje, o 216JR izoliatas – L-ramnozės terpėje. Tuo tarpu, 169JR aktinobakterijų izoliatas neaugo D-galaktozės terpėje, o 112JR izoliatas – D-galaktozės ir D-fruktozės terpėse. Skirtingos pH reikšmės (pH 5 ir pH 6) D-gliukozės terpėse augo visi 19 bioaktyvių izoliatų.

3.1.2 lentelė. Skirtingų anglies šaltinių terpėse augusių aktinobakterijų izoliatų augimo įvertinimas. (+) – aktinobakterijų izoliato augimas anglies šaltinio terpėje pastebėtas, (-) – augimas nepastebėtas.

Aktinobakterijų izoliatas	Anglies šaltiniai					
	D-gliukozė	D-fruktozė	D-galaktozė	L-ramnozė	D-ksilozė	Laktozė
7Mb	+	+	+	+	-	+
5.3g	+	+	+	+	+	+
5.4c	+	+	+	+	-	+
5.4d	+	+	+	+	+	+
8M(C)	+	-	+	+	-	+
5OH	+	-	+	+	-	+
213JR	+	+	+	+	+	+
8Mb	+	+	+	+	+	+
1OH	+	+	+	+	+	+
1.K	+	+	+	+	+	+
12.B.1	+	-	-	+	-	+
12.B.2	+	-	-	+	+	+
160JR	+	-	-	+	+	+
107JR	+	-	+	+	+	+
192JR	+	-	+	+	-	+
114JR	+	+	+	+	+	+
216JR	+	+	+	-	+	+
169JR	+	+	-	+	+	+
112JR	+	-	-	+	+	+

Nustatyta, kad visi bioaktyvūs aktinobakterijų izoliatai auga terpėje esant D-gliukozės ir laktozės anglies šaltiniams.

3.2.1. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis *Saccharomyces cerevisiae* α' 1 mielėms, tiriamas diskų metodu

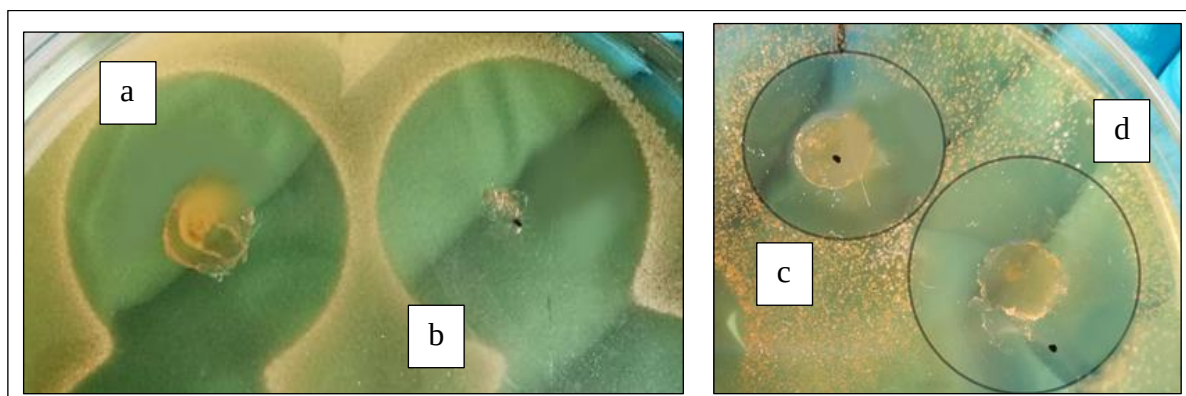
Tyrimų rezultatai parodė, kad uždėjus ant *S. cerevisiae* α' 1 gazono diskus su aktinobakterijų kultūromis stipriausiu aktyvumu pasižymėjo 7Mb izoliatas (inhibicinė zona $2,6 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$), augęs laktozės terpėje (3.2.1 pav.), bei 8M(C) ir 1OH izoliatai, augę D-galaktozės terpėje (abiejų izoliatų inhibicinės zonos $2,6 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$) (3.2.1 lentelė).

3.2.1 lentelė: Aktinobakterijų, kultivuotų su skirtingais anglies šaltiniais, inhibicinių zonų dydžiai ant *S. cerevisiae* α '1 mielių gazono – diskų metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm 0,1$ cm).

Aktinobakterijų izoliatai	Anglies šaltiniai					
	D-gliukozė	D-fruktozė	D-galaktozė	L-ramnozė	D-ksilozė	Laktozė
	Inhibicinės zonos dydis, cm					
7Mb	2,25*	2,5	1,9	2,4	X	2,6
5.3g	1,8	2,0	1,2	1,4	1,75	1,2
5.4c	1,5	1,6	1,9	1,7	X	1,7
5.4d	1,8	-	-	-	-	-
8M(C)	2,0	X	2,6	2,0	X	2,0
5OH	1,2	X	1,0	-	X	-
213JR	1,3	1,3	1,4	1,2	1,3	1,7
8Mb	-	-	-	0,7	-	-
1OH	2,5	2,5	2,6	2,4	1,4	1,3
1K	1,9	2,2	1,4	1,4	2,3	1,3
12.B.1	2,1	X	X	1,8	X	2,0
12.B.2	2,1	X	X	1,7	2,0	2,0
160JR	1,5	X	X	1,8	2,0	1,5
107JR	1,9	X	1,4	1,8	1,7	1,5
192JR	2,3	X	2,2	1,1	X	1,7
114JR	1,4	-	1,1	1,6	1,6	1,2
216JR	1,6	1,7	1,4	X	1,8	1,4
169JR	1,7	1,4	X	0,8	1,9	1,8
112JR	2,2	X	X	1,2	2,0	1,8

* - įskaitant diską (0,7 cm). (-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos. X – aktinobakterijų izoliatas toje terpėje neaugo.

5.4d izoliatas išskyrė bioaktyvias medžiagas tik augdamas D-gliukozės terpėje, o 8Mb izoliatas – L-ramnozės terpėje. 5OH izoliatas neparodė antagonistinio poveikio *S. cerevisiae* α '1 mielių gazonui augdamas L-ramnozės ir laktozės terpėse, o 114JR izoliatas – D-fruktozės terpėje.



3.2.1 pav. Aktinobakterijų izoliato 7Mb, augusio laktozės terpėje (a – diskų metodas, b – taško metodas) ir aktinobakterijos 8M(C) izoliato diskų metodas (augęs D-gliukozės terpėje – c, D-galaktozės terpėje – d); poveikis *S. cerevisiae* α '1 mielėms.

Remiantis gautais duomenimis, vertinant skirtingų anglies šaltinių mitybines terpes daugumos aktinobakterijų izoliatų didžiausias aktyvumas pasireiškė jiems augant D-gliukozės terpėje, nors didžiausia skaitinė reikšmė užfiksuota auginant izoliatų terpėje su D-galaktoze ir laktoze.

3.2.2. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis *Saccharomyces cerevisiae* α '1 mielėms, tiriamas taško metodu

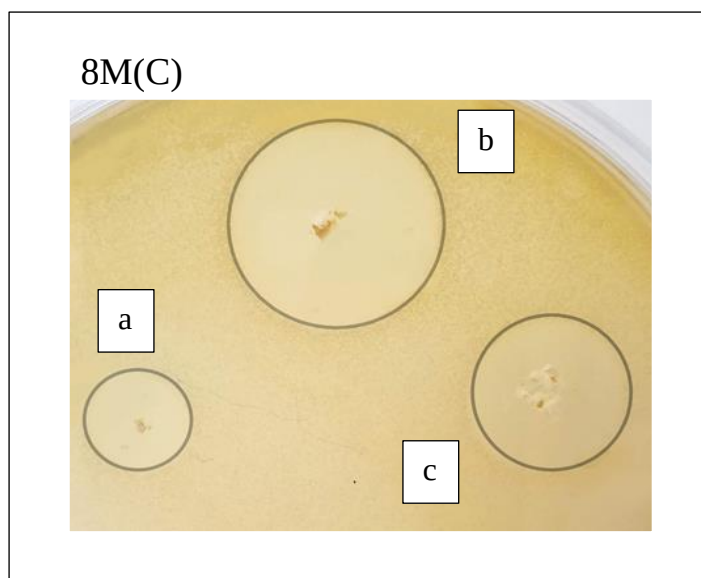
Tyrimų rezultatai parodė, kad taško metodu tiriant bioaktyvius aktinobakterijų izoliatų ant *S. cerevisiae* α '1 gazono stipriausiu aktyvumu pasižymėjo 7Mb izoliatas, augęs D-galaktozės ir laktozės terpėse (inhibicinė zona $2,6 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$) (3.2.2. lentelė).

3.2.2. lentelė: Aktinobakterijų kultivuotų su skirtingais anglies šaltiniais inhibicinių zonų dydžiai ant *S. cerevisiae* α '1 mielių gazono – taško metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm 0,1 \text{ cm}$).

Aktinobakterijų izoliatai	Anglies šaltiniai					
	D-gliukozė	D-fruktozė	D-galaktozė	L-ramnozė	D-ksilozė	Laktozė
	Inhibicinės zonos dydis, cm					
7Mb	2,45	2,55	2,6	2,5	X	2,6
5.3g	1,9	2,2	1,3	0,7	0,8	0,9
5.4c	1,5	2,0	1,7	1,9	X	1,6
5.4d	0,2	-	-	-	-	-
8M(C)	2,1	X	1,6	1,0	X	1,0
5OH	-	X	-	-	X	-
213JR	0,3	0,7	-	-	0,5	0,4
8Mb	-	-	-	-	-	-
1OH	1,9	2,0	1,9	2,0	1,2	-
1K	1,4	1,4	1,7	0,6	1,1	-
12.B.1	1,3	X	X	1,3	X	1,2
12.B.2	1,3	X	X	1,4	1,5	1,2
160JR	0,9	X	X	0,8	0,5	-
107JR	0,7	X	0,7	-	0,9	0,4
192JR	1,1	X	0,6	0,4	X	1,0
114JR	0,9	0,3	0,4	-	0,9	0,4
216JR	0,9	1,3	1,0	X	0,7	0,3
169JR	0,8	0,6	X	0,6	0,6	0,7
112JR	1,1	X	X	0,3	1,0	1,1

(-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos. X – aktinobakterijų izoliatas toje terpėje neaugo.

Aktinobakterijų 5.4d izoliatas išskyrė bioaktyvias medžiagas tik augdamas D-gliukozės terpėje, o 8Mb ir 5OH izoliatai – neparodė jokio aktyvumo, kai tuo tarpu diskų metodu aktyvumas užfiksuotas (3.2.1. ir 3.2.2. lentelėse). 213JR izoliatas bioaktyvių medžiagų neišskyrė augdamas D-galaktozės ir L-ramnozės, kaip anglies šaltiniuose, mitybinėje terpėje. Aktinobakterijų 1OH, 1K ir 160JR izoliatai aktyvumu nepasižymėjo kai buvo auginti su laktoze, o 107JR ir 114JR izoliatai – su L-ramnoze. Aktinobakterijų izoliatas 8M(C) taip pat darė ganėtinai didelį poveikį *S. cerevisiae* α '1 mielėms (3.2.2 pav.).



3.2.2 pav. Aktinobakterijų izoliato 8M(C), užnešto kilpele ir augusio: L-ramnozės terpėje – a, D-gliukozės terpėje – b, D-galaktozės terpėje – c; poveikis *S. cerevisiae* α '1 mielėms.

Vertinant skirtingų anglies šaltinių mitybines terpes daugumos izoliatų didžiausias antagonistinis aktyvumas pasireiškė jiems augant D-gliukozės bei D-fruktozės terpėse, nors didžiausia skaitinė reikšmė užfiksuota D-galaktozės ir laktozės terpės mėginiuose. Aktinobakterijų aktyvumas priklausė nuo anglies šaltinio terpėje, tačiau visi 19 bioaktyvių izoliatų veikė *S. cerevisiae* α '1 mieles. Įvertinus abiejų metodų rezultatus, daugumoje atvejų, aktinobakterijų izoliatų aktyvumas yra didesnis tiriamas diskų metodu nei taško metodu. Tai parodo, kad dalis mielių augimą stabdančių medžiagų yra galimai aktyviai išskiriamos į terpę egzogeniškai. Todėl uždėjus aktinobakterijų izoliato diską kartu su kultūra ir galimai agare esančiomis egzogeninėmis medžiagomis, daugumos izoliatų atveju gauta inhibicinė zona yra platesnė nei užnešus pačią kultūrą kilpele. Kai kuriais atvejais, aktinobakterijų izoliato bioaktyvumas, tikrintas vienu iš metodų (dažniausiai taško) išvis nepastebimas, nors antruoju iš metodų įvertintas mėginys formuoja inhibicinę zoną ir parodo antagonistinį poveikį mielėms.

3.3.1. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis *Candida parapsilosis* mielėms, tiriamas diskų metodu

Tyrimų rezultatai parodė, kad uždėjus ant *C. parapsilosis* gazono diskus su aktinobakterijų kultūromis stipriausiu aktyvumu pasižymėjo 7Mb izoliatas (inhibicinė zona 2,6 cm $\pm$ 0,1 cm; (3.3. pav.)), augęs laktozės terpėje (3.3.1 lentelė).

3.3.1 lentelė: Aktinobakterijų, kultivuotų su skirtingais anglies šaltiniais, inhibicinių zonų dydžiai ant *C. parapsilosis* mielių gazono – diskų metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm$ 0,1 cm).

Aktinobakterijų izoliatai	Anglies šaltiniai					
	D-gliukozė	D-fruktozė	D-galaktozė	L-ramnozė	D-ksilozė	Laktozė
	Inhibicinės zonos dydis, cm					
7Mb	2,1*	-	2,1	2,0	X	2,6
5.3g	-	-	-	-	-	-
5.4c	0,9	-	1,1	1,2	X	1,4
5.4d	1,0	-	-	-	-	-
8M(C)	1,7	X	1,9	1	X	1,8
5OH	-	X	-	-	X	-
213JR	-	-	-	-	-	0,7
8Mb	-	-	-	-	-	-
1OH	-	0,9	-	-	0,9	-
1K	0,7	0,8	0,9	-	0,8	-
12.B.1	1,1	X	X	0,8	X	1,0
12.B.2	0,8	X	X	-	0,8	0,7
160JR	-	X	X	-	-	-
107JR	-	X	-	-	-	-
192JR	-	X	-	-	X	-
114JR	-	-	-	-	-	-
216JR	-	-	-	X	-	-
169JR	-	-	X	-	-	-
112JR	-	X	X	-	-	-

* - įskaitant diską (0,7 cm). (-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos. X – aktinobakterijų izoliatas toje terpėje neaugo.

Tirti 5.3g, 5OH, 8Mb, 160JR, 107JR, 192JR, 114JR, 216JR, 169JR ir 112JR aktinobakterijų izoliatai *C. parapsilosis* mielėms neparodė jokio antagonistinio aktyvumo. 7Mb ir 5.4c izoliatai aktyvumo neparodė tik augdami D-fruktozės terpėje. Aktinobakterijų 5.4d izoliatas išskyrė bioaktyvias medžiagas tik augdamas D-gliukozės terpėje, o 213JR izoliatas – laktozės terpėje. 1OH aktinobakterijų izoliatas parodė antagonistinį poveikį *C. parapsilosis* mielėms augdamas tik D-fruktozės ir D-ksilozės terpėse. Tuo tarpu, 1K aktinobakterijų izoliatas bioaktyvias medžiagas išskyrė tik D-gliukozės, D-fruktozės, D-galaktozės ir D-ksilozės

terpėse. Aktinobakterijų 12.B.2 izoliatas aktyvumo prieš *C. parapsilosis* neparodė tik augdamas L-ramnozės terpėje.

3.3.2. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis *Candida parapsilosis* mielėms, tiriamas taško metodu

Tyrimų rezultatai parodė, kad taško metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *C. parapsilosis* mielėms stipriausiu aktyvumu pasižymėjo 7Mb izoliatas (3.3. pav.), augęs laktozės terpėje (inhibicinė zona 2,4 cm $\pm$ 0,1 cm) (3.3.2 lentelė).

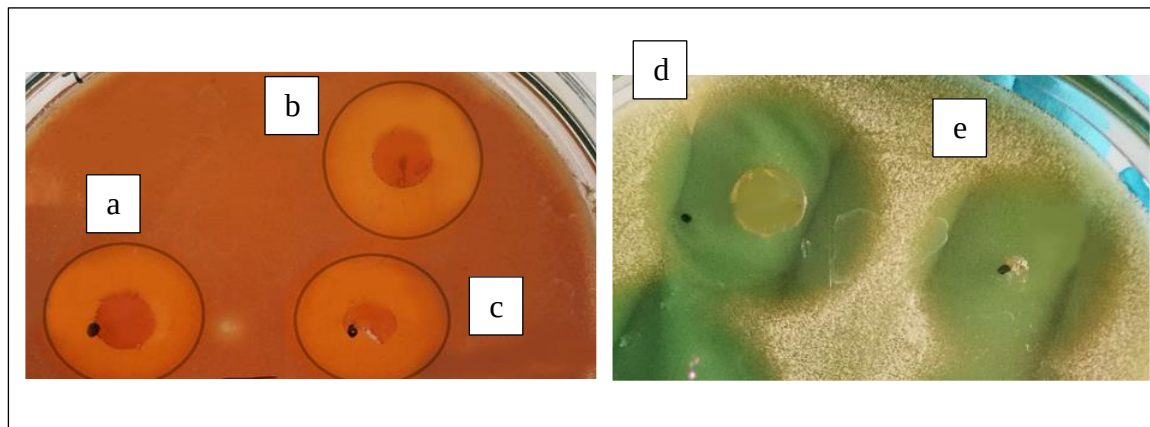
3.3.2 lentelė: Aktinobakterijų kultivuotų su skirtingais anglies šaltiniais inhibicinių zonų dydžiai ant *C. parapsilosis* mielių gazono – taško metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm$ 0,1 cm).

Aktinobakterijų izoliatai	Anglies šaltiniai					
	D-gliukozė	D-fruktozė	D-galaktozė	L-ramnozė	D-ksilozė	Laktozė
	Inhibicinės zonos dydis, cm					
7Mb	1,8	1,5	1,4	1,1	X	2,4
5.3g	-	-	-	-	-	-
5.4c	0,3	-	0,8	0,7	X	1,2
5.4d	-	-	-	-	-	-
8M(C)	2,0	X	1,8	1,6	X	0,5
5OH	-	X	-	-	X	-
213JR	-	-	-	-	-	-
8Mb	-	-	-	-	-	-
1OH	1,2	-	1,5	0,8	-	0,8
1K	-	0,8	-	-	-	-
12.B.1	0,4	X	X	-	X	-
12.B.2	0,4	X	X	0,3	0,4	0,4
160JR	-	X	X	-	-	-
107JR	-	X	-	-	-	-
192JR	-	X	-	-	X	-
114JR	-	-	-	-	-	-
216JR	-	0,6	-	X	-	-
169JR	-	-	X	-	-	-
112JR	-	X	X	-	-	-

(-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos. X – aktinobakterijų izoliatas toje terpėje neaugo.

Aktinobakterijų izoliatai 5.3g, 5.4d, 5OH, 213JR, 8Mb, 160JR, 107JR, 192JR, 114JR, 169JR ir 112JR jokio antagonistinio aktyvumo *C. parapsilosis* mielėms neparodė. Aktinobakterijų 5.4c izoliatas aktyvumo neparodė tik augdamas D-fruktozės terpėje. Aktinobakterijų izoliatas 1OH parodė antagonistinį poveikį mielėms augdamas tik D-gliukozės, D-galaktozės, L-ramnozės ir laktozės terpėse. Tuo tarpu, 1K ir 216JR izoliatai bioaktyvūs medžiagas išskyrė tik D-fruktozės terpėje, o 12.B.1 izoliatas – tik D-gliukozės terpėje.

Įvertinus abiejų metodų rezultatus, daugumos izoliatų atveju, diskų metodo efektyvumas prieš *C. parapsilosis* yra didesnis nei taško metodo. Vis dėlto, aktinobakterijų 10H izoliatas diskų metodu rodė aktyvumą tik D-fruktozės ir D-ksilozės terpėse, o taško metodu – atvirkščiai – D-fruktozės ir D-ksilozės terpėse nerodė aktyvumo, tačiau rodė visose kitose. Taigi, išskirtinių izoliatų atveju, aktinobakterija, užnešta taško metodu, rodo antimikrobinį aktyvumą.



3.3 pav. Aktinobakterijų izoliato 7Mb, augusio: D-galaktozės terpėje – a, D-gliukozės – b, L-ramnozės – c, d ir e – laktozės terpėse poveikis *Candida parapsilosis* mielėms. a, b – diskų metodas, c – diskų metodas, d – diskų metodas ir e – taško metodas.

Remiantis gautais duomenimis, vertinant skirtingų anglies šaltinių mitybines terpes daugumos izoliatų didžiausias antagonistinis aktyvumas *C. parapsilosis* mielėms pasireiškė jiems augant D-gliukozės ir laktozės terpėse, o didžiausia skaitinė reikšmė užfiksuota būtent laktozės terpės mėginiuose. Aktinobakterijų aktyvumas priklausė nuo anglies šaltinio terpėje, tačiau 9 iš 19 bioaktyvių aktinobakterijų izoliatų *C. parapsilosis* mielėms nedarė jokio poveikio (~ 47 % izoliatų).

3.4.1. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produktojamų medžiagų poveikis *Candida albicans* mielėms, tiriamas diskų metodu

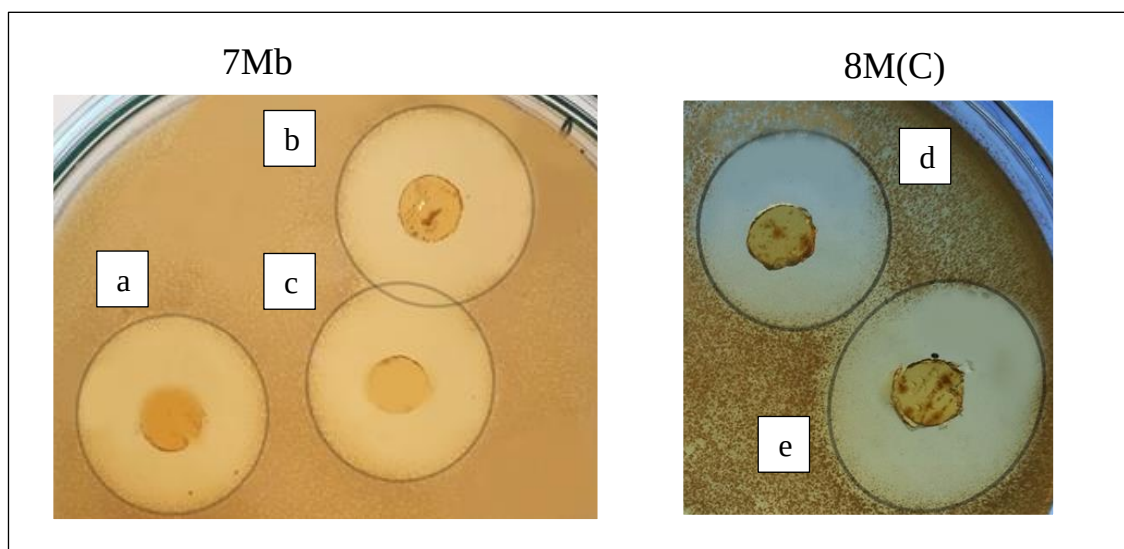
Tyrimų rezultatai parodė, kad diskų metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *C. albicans* mielėms stipriausiu aktyvumu pasižymėjo 7Mb izoliatas (inhibicinė zona $3,1 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$; (3.4 pav.)), augęs laktozės terpėje (3.4.1 lentelė).

3.4.1 lentelė: Aktinobakterijų, kultivuotų su skirtingais anglies šaltiniais, inhibicinių zonų dydžiai ant *C. albicans* mielių gazono – diskų metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm 0,1$ cm).

Aktinobakterijų izoliatai	Anglies šaltiniai					
	D-gliukozė	D-fruktozė	D-galaktozė	L-ramnozė	D-ksilozė	Laktozė
	Inhibicinės zonos dydis, cm					
7Mb	2,3*	-	2,3	2,2	X	3,1
5.3g	-	-	-	-	1,6	0,9
5.4c	1,2	-	1,0	0,9	X	1,7
5.4d	1,5	-	-	-	-	-
8M(C)	2,6	X	2,0	1,4	X	1,3
5OH	-	X	-	-	X	-
213JR	0,7	1,0	1,0	1,4	1,3	1,3
8Mb	-	-	-	-	-	-
10H	-	-	0,7	-	1,3	-
1K	1,5	2,8	1,9	1,6	1,6	1,0
12.B.1	1,9	X	X	1,6	X	1,6
12.B.2	1,5	X	X	1,3	1,7	1,3
160JR	0,9	X	X	1,1	1,3	0,9
107JR	1,2	X	1,1	1,3	1,0	1,0
192JR	1,1	X	1,1	-	X	1,5
114JR	-	-	-	-	-	-
216JR	1,6	0,9	1,6	X	1,5	0,9
169JR	1,0	0,9	X	-	1,0	1,2
112JR	1,4	X	X	-	1,6	1,2

* - įskaitant diską (0,7 cm). (-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos. X – aktinobakterijų izoliatas toje terpėje neaugo.

Aktinobakterijų izoliatai 5OH, 8Mb ir 114JR jokio antagonistinio aktyvumo *C. albicans* mielėms neparodė.



3.4. pav. Aktinobakterijų izoliato 7Mb, augusio: D-galaktozės terpėje – a, D-gliukozės – b, L-ramnozės terpėje – c; ir aktinobakterijų izoliato 8M(C), augusio: D-galaktozės – d ir D-gliukozės – e terpėse diskų metodo poveikis *C. albicans* mielėms.

Aktinobakterijų 7Mb ir 5.4c izoliatai bioaktyvių medžiagų neišskyrė tik D-fruktozės terpėje. Tuo tarpu, aktinobakterijų izoliatas 5.3g aktyvumą parodė tik augdamas D-ksilozės ir laktozės mitybinėse terpėse, 5.4d izoliatas – tik D-gliukozės terpėje, o 1OH izoliatas – tik D-galaktozės ir D-ksilozės terpėse. Tik L-ramnozės terpėje augę 192JR, 169JR ir 112JR izoliatai nesudarė inhibicinių zonų.

Vertinant skirtingų anglies šaltinių mitybines terpes daugumos aktinobakterijų izoliatų didžiausias antagonistinis aktyvumas pasireiškė jiems augant D-gliukozės, laktozės bei D-ksilozės terpėse, o didžiausia skaitinė reikšmė užfiksuota mitybinėje terpėje su laktoze.

3.4.2. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis *Candida albicans* mielėms, tiriamas taško metodu

Tyrimų rezultatai parodė, kad taško metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *C. albicans* mielėms stipriausiu aktyvumu pasižymėjo 7Mb izoliatas, augęs laktozės terpėje (inhibicinė zona $3,1\text{ cm} \pm 0,1\text{ cm}$) (3.4.2. lentelė).

Aktinobakterijų izoliatai 5.4d, 5OH, 8Mb ir 114JR taško metodu ant *C. albicans* gazono neparodė jokio antagonistinio aktyvumo. Aktinobakterijų 5.4c izoliatas bioaktyvių medžiagų neišskyrė tik D-fruktozės terpėje, o 112JR izoliatas – L-ramnozės terpėje. 1OH aktinobakterijų izoliatas, augęs D-fruktozės ir D-ksilozės terpėse, 1K izoliatas, augęs L-ramnozės ir laktozės terpėse, 160JR izoliatas, augęs D-ksilozės ir laktozės terpėse, bei 216JR izoliatas, augęs D-galaktozės ir laktozės terpėse, bioaktyvumo neparodė. Tuo tarpu, aktinobakterijų 5.3g izoliatas aktyvumą parodė tik augdamas D-ksilozės ir laktozės mitybinėse terpėse, 213JR izoliatas – tik D-galaktozės, D-ksilozės bei laktozės terpėse, o 107JR izoliatas – tik D-gliukozės ir D-ksilozės terpėse. Aktinobakterijų izoliatas 192JR bioaktyvias medžiagas išskyrė tik augęs laktozės terpėje, o 169JR izoliatas – D-gliukozės terpėje.

3.4.2 lentelė: Aktinobakterijų kultivuotų su skirtingais anglies šaltiniais inhibicinių zonų dydžiai ant *C. albicans* mielių gazono – taško metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm 0,1$ cm).

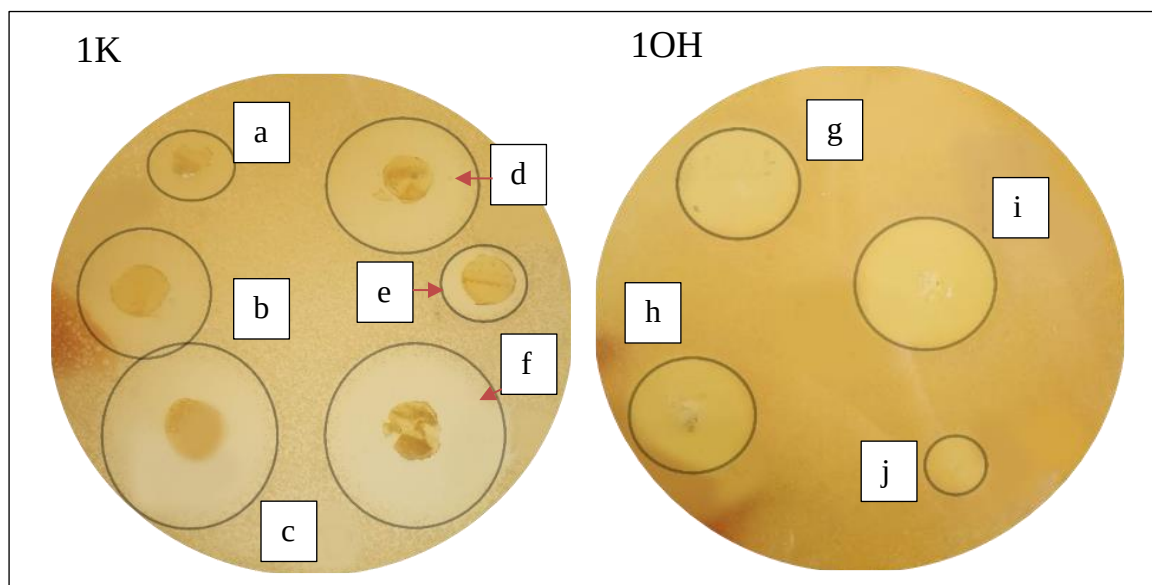
Aktinobakterijų izoliatai	Anglies šaltiniai					
	D-gliukozė	D-fruktozė	D-galaktozė	L-ramnozė	D-ksilozė	Laktozė
	Inhibicinės zonos dydis, cm					
7Mb	2,1	1,1	1,7	2	X	3,1
5.3g	-	-	-	-	0,3	0,5
5.4c	0,4	-	1,1	0,8	X	1,8
5.4d	-	-	-	-	-	-
8M(C)	1,8	X	1,4	0,4	X	0,6
5OH	-	X	-	-	X	-
213JR	-	-	1	-	0,3	0,3
8 Mb	-	-	-	-	-	-
1OH	1,6	-	0,9	1,9	-	1,2
1K	0,8	1,1	0,3	-	0,9	-
12.B.1	0,3	X	X	0,3	X	0,5
12.B.2	0,4	X	X	0,7	0,6	0,5
160JR	0,4	X	X	0,8	-	-
107JR	0,5	X	-	-	0,2	-
192JR	-	X	-	-	X	0,4
114JR	-	-	-	-	-	-
216JR	0,3	0,5	-	X	0,3	-
169JR	0,3	-	X	-	-	-
112JR	0,3	X	X	-	0,3	0,3

(-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos. X – aktinobakterijų izoliatas toje terpėje neaugo.

Vertinant aktinobakterijų izolatus, augusius mitybinėse terpėse su skirtingais anglies šaltiniais, daugumos aktinobakterijų izolatų didžiausias antagonistinis aktyvumas pasireiškė jiems augant laktozės terpėje, kur ir užfiksuota didžiausia skaitinė reikšmė. Aktinobakterijų aktyvumas priklausė nuo anglies šaltinio terpėje, tačiau 3 iš 19 (~ 16 %) bioaktyvių izolatų poveikio *C. albicans* mielėms išvis neparodė. Įvertinus abiejų metodų rezultatus, daugumoje atvejų, diskų metodo aktyvumas yra didesnis nei taško metodo.

3.5.1. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produktojamų medžiagų poveikis *Saccharomyces cerevisiae* mielėms, tiriamas diskų metodu

Tyrimų rezultatai parodė, kad diskų metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *S. cerevisiae* mielėms stipriausiu aktyvumu pasižymėjo aktinobakterijų 1K izoliatas (3.5 pav.), augęs D-fruktozės terpėje (inhibicinė zona $2,5\text{ cm} \pm 0,1\text{ cm}$) ir augęs D-ksilozės terpėje (inhibicinė zona $2,4\text{ cm} \pm 0,1\text{ cm}$) (3.5.1 lentelė).



3.5 pav. Aktinobakterijų izoliato 1K, augusio: D-gliukozės terpėje – a, L-ramnozės – b, D-ksilozės – c, D-galaktozės – d, laktozės – e ir D-fruktozės – f; terpėse diskų metodo poveikis *S. cerevisiae* mielėms, bei aktinobakterijų izoliato 1OH, augusio: D-galaktozės – g, D-gliukozės – h, L-ramnozės – i ir laktozės – j; terpėse taško metodo mėginių poveikis *S. cerevisiae* mielėms.

Aktinobakterijų izoliatai 5OH, 8Mb ir 114JR *S. cerevisiae* mielėms neparodė jokio antagonistinio aktyvumo. Aktinobakterijų 7Mb ir 5.4c izoliatai, augę D-fruktozės terpėje, bioaktyvių antagonistinių medžiagų neišskyrė. Aktinobakterijų 5.3g izoliatas neparodė bioaktyvumo D-fruktozės ir D-galaktozės terpėse, 1OH – D-gliukozės ir laktozės terpėse, o 192JR ir 169JR aktinobakterijų izoliatai neparodė aktyvumo augę atitinkamai D-gliukozės ir L-ramnozės terpėse. Aktinobakterijų 5.4d izoliatas bioaktyvias medžiagas išskyrė tik augdamas D-gliukozės terpėje.

3.5.1 lentelė: Aktinobakterijų, kultivuotų su skirtingais anglies šaltiniais, inhibicinių zonų dydžiai ant *S. cerevisiae* mielių gazono – diskų metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm 0,1$ cm).

Aktinobakterijų izoliatai	Anglies šaltiniai					
	D-gliukozė	D-fruktozė	D-galaktozė	L-ramnozė	D-ksilozė	Laktozė
	Inhibicinės zonos dydis, cm					
7Mb	1,9*	-	1,7	1,9	X	2,2
5.3g	0,6	-	-	0,7	1,5	0,9
5.4c	1,1	-	1,5	1,4	X	1,6
5.4d	1,6	-	-	-	-	-
8M(C)	2	X	1,7	1,5	X	1,7
5OH	-	X	-	-	X	-
213JR	1,2	1,3	0,8	1,6	0,7	1,1
8Mb	-	-	-	-	-	-
1OH	-	1	1	0,9	1,9	-
1K	1,2	2,5	2,3	1,9	2,4	1
12.B.1	1,9	X	X	1,6	X	1,7
12.B.2	1,5	X	X	1,4	1,6	1,7
160JR	1,4	X	X	1,5	1,9	1,2
107JR	1,5	X	1,3	1,2	1,1	1,3
192JR	-	X	1	0,7	X	1,5
114JR	-	-	-	-	-	1
216JR	1,1	1	1	X	0,9	1,1
169JR	0,9	1,1	X	-	1,4	1,3
112JR	1,6	X	X	0,8	1,6	1,6

* - įskaitant diską (0,7 cm). (-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos. X – aktinobakterijų izoliatas toje terpėje neaugo.

Remiantis gautais duomenimis, vertinant skirtingų anglies šaltinių mitybines terpes daugumos aktinobakterijų izoliatų didžiausias aktyvumas pasireiškė jiems augant D-gliukozės, D-ksilozės ir laktozės terpėse, nors didžiausia skaitinė reikšmė užfiksuota D-fruktozės ir D-ksilozės terpių mėginiuose.

3.5.2. Aktinobakterijų, kultivuotų terpėje su skirtingais anglies šaltiniais, produkuojamų medžiagų poveikis *Saccharomyces cerevisiae* mielėms, tiriamas taško metodu

Tyrimų rezultatai parodė, kad taško metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *S. cerevisiae* mielėms stipriausiu aktyvumu pasižymėjo 7Mb izoliatas, augęs laktozės terpėje (inhibicinė zona $1,7 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$) ir 1OH izoliatas, augęs L-ramnozės terpėje (inhibicinė zona $1,8 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$) (3.5.2 lentelė).

3.5.2 lentelė: Aktinobakterijų kultivuotų su skirtingais anglies šaltiniais inhibicinių zonų dydžiai ant *S. cerevisiae* mielių gazono – taško metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm 0,1$ cm).

Aktinobakterijų izoliatai	Anglies šaltiniai					
	D-gliukozė	D-fruktozė	D-galaktozė	L-ramnozė	D-ksilozė	Laktozė
	Inhibicinės zonos dydis, cm					
7Mb	0,9	0,9	0,3	1,1	X	1,7
5.3g	-	-	0,3	-	0,3	0,3
5.4c	1	0,5	0,9	1,1	X	1,2
5.4d	-	-	-	-	-	-
8M(C)	2	X	1,3	1,2	X	0,8
5OH	-	X	-	-	X	-
213JR	0,4	0,2	0,9	0,3	0,4	0,4
8Mb	-	-	-	-	-	-
1OH	1,5	-	1,5	1,8	-	0,8
1K	0,3	1,2	0,7	0,8	1,1	-
12.B.1	1	X	X	1,2	X	1,3
12.B.2	1,1	X	X	0,6	1,4	0,9
160JR	0,3	X	X	0,7	1	0,4
107JR	0,4	X	0,4	0,4	0,3	-
192JR	-	X	-	-	X	0,6
114JR	0,3	-	-	-	-	0,3
216JR	0,7	1	0,7	X	0,8	0,3
169JR	0,7	0,3	X	-	-	0,3
112JR	0,8	X	X	0,4	0,9	0,9

(-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos. X – aktinobakterijų izoliatas toje terpėje neaugo.

Aktinobakterijų izoliatai 5.4d, 5OH ir 8Mb *S. cerevisiae* mielėms neparodė jokio antagonistinio aktyvumo. Aktinobakterijų izoliatai 1K ir 107JR, augę laktozės terpėje, bioaktyvių antagonistinių medžiagų neišskyrė. Aktinobakterijų 5.3g izoliatas neparodė bioaktyvumo D-gliukozės, D-fruktozės ir L-ramnozės terpėse, 1OH izoliatas – D-fruktozės ir D-ksilozės terpėse, o 169JR izoliatas neparodė aktyvumo augęs L-ramnozės ir D-ksilozės terpėse. 114JR izoliatas bioaktyvias medžiagas išskyrė tik augdamas D-gliukozės ir laktozės terpėse, o 192JR aktinobakterijų izoliatas – tik laktozės terpėje.

Vertinant aktinobakterijų izolatus, augusius mitybinėse terpėse su skirtingais anglies šaltiniais, daugumos izoliatų didžiausias antagonistinis aktyvumas pasireiškė jiems augant mitybinėje terpėje su laktoze, kur buvo užfiksuota viena iš didžiausių inhibicinių zonų reikšmių. Aktinobakterijų antagonistinis aktyvumas priklausė nuo anglies šaltinio terpėje, tačiau 2 iš 19 (~ 11 %) bioaktyvių izoliatų poveikio *S. cerevisiae* mielėms išvis neparodė. Įvertinus abiejų metodų rezultatus, daugumoje atvejų, diskų metodo aktyvumas yra didesnis nei taško.

3.6.1. Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis *Saccharomyces cerevisiae* α '1 mielėms, tiriamas diskų metodu

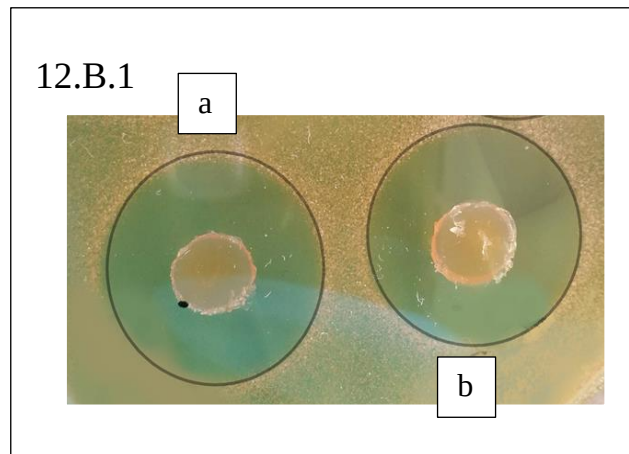
Tyrimų rezultatai parodė, kad diskų metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *S. cerevisiae* α '1 mielėms stipriausiu aktyvumu pasižymėjo 5OH izoliatas, augęs pH 5 terpėje (inhibicinė zona 4 cm $\pm$ 0,1 cm) ir 5OH izoliatas, augęs pH 6 terpėje (inhibicinė zona 3,8 cm $\pm$ 0,1 cm) (3.6.1 lentelė).

3.6.1 lentelė: Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, inhibicinių zonų dydžiai ant *S. cerevisiae* α '1 mielių gazono – diskų metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm$ 0,1 cm).

Aktinobakterijų izoliatai	pH reikšmės	
	pH 5	pH 6
	Inhibicinės zonos dydis, cm	
7Mb	2,7*	2,6
5.3g	2,0	2,0
5.4c	1,8	1,7
5.4d	2,0	2,1
8M(C)	1,3	3,0
5OH	4,0	3,8
213JR	1,5	1,0
8Mb	1,5	1,9
1OH	2,8	1,6
1K	1,6	1,6
12.B.1	2,3	2,4
12.B.2	2,0	2,1
160JR	1,4	1,7
107JR	1,9	2,0
192JR	2,0	1,9
114JR	1,2	1,8
216JR	1,9	1,5
169JR	2,0	1,7
112JR	2,3	1,9

* - įskaitant diską (0,7 cm).

Visi tiriami aktinobakterijų izoliatai *Saccharomyces cerevisiae* α '1 mielėms parodė antagonistinį aktyvumą.

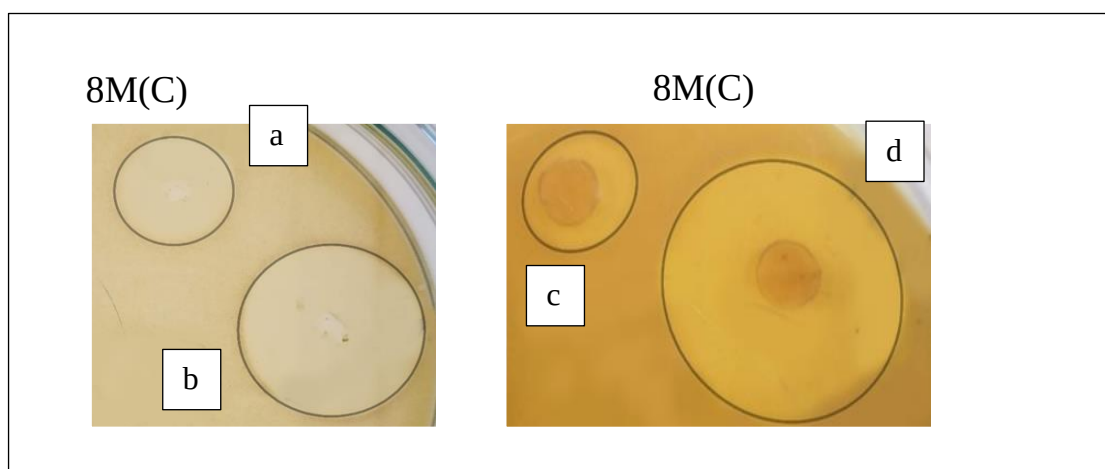


3.6.1 pav. Aktinobakterijų izoliato 12.B.1, augusio skirtingose gliukozės terpės pH reikšmėse: pH 6 – a, pH 5 – b; diskų metodo mėginių poveikis *S. cerevisiae* α '1 mielėms.

7Mb, 5.4c, 5OH, 213JR, 1OH, 192JR, 216JR, 169JR ir 112JR aktinobakterijų izoliatai (~ 47 %) buvo aktyvesni augę esant terpės pH 5, o 5.4d, 8M(C), 8Mb, 12.B.1 (3.6.1 pav.), 12.B.2, 160JR, 107JR ir 114JR izoliatai (~ 42 %) – pH 6 terpėje.

3.6.2 Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis *Saccharomyces cerevisiae* α '1 mielėms, tiriamas taško metodu

Tyrimų rezultatai parodė, kad taško metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *S. cerevisiae* α '1 mielėms stipriausiu aktyvumu pasižymėjo 7Mb izoliatas, augęs pH 5 mitybinėje terpėje (inhibicinė zona 2,8 cm $\pm$ 0,1 cm) ir 7Mb izoliatas, augęs pH 6 terpėje (inhibicinė zona 2,8 cm $\pm$ 0,1 cm) (3.6.2 lentelė).



3.6.2 pav. Aktinobakterijų izoliato 8M(C), augusio skirtingose terpės pH reikšmėse taško metodu: pH 5 – a, pH 6 – b; bei disko metodu: pH 5 – c; pH 6 – d; poveikis *Saccharomyces cerevisiae* α '1 mielėms.

Nors ant *S. cerevisiae* α '1 mielių gazono uždėjus diskus su aktinobakterijų kultūromis visi tiriami izoliatai mielėms parodė antagonistinį aktyvumą, užnešus aktinobakterijų izoliatus taško metodu, 5OH (plačiausiomis inhibicinėmis zonomis pasižymėjęs izoliatas) ir 8Mb izoliatai neparodė jokio aktyvumo. Jei mielėms antagonistinės medžiagos aktinobakterijų izoliatų yra sekretuojamos tik į terpę, užnešus aktinobakterijų izoliatą taško metodu, kai kuriais atvejais nepastebima jokio aktyvumo, kitaip nei uždėjus ant mielių gazono diską su terpe ir aktinobakterijų kultūra (5OH ir 8Mb izoliatai buvo aktyvūs). 5.4d, 1K, 12.B.2, 192JR ir 169JR izoliatai (~ 26 %) buvo aktyvesni augę pH 5, o 5.3g, 5.4c, 8M(C) (3.6.2 pav.), 213JR, 1OH, 12.B.1, 160JR, 114JR, 216JR ir 112JR izoliatai (~ 53 %) – pH 6 terpėje.

3.6.2 lentelė: Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, inhibicinių zonų dydžiai ant *S. cerevisiae* α '1 mielių gazono – taško metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm$ 0,1 cm).

Aktinobakterijų izoliatai	pH reikšmės	
	pH 5	pH 6
	Inhibicinės zonos dydis, cm	
7Mb	2,8	2,8
5.3g	1,6	1,7
5.4c	1,5	1,8
5.4d	0,9	0,6
8M(C)	1,4	2,5
5OH	-	-
213JR	0,5	0,8
8Mb	-	-
1OH	1,5	1,8
1K	1,0	0,6
12.B.1	1,4	1,8
12.B.2	1,6	1,5
160JR	0,6	1,0
107JR	0,9	0,9
192JR	1,3	1,2
114JR	0,4	0,5
216JR	0,7	0,8
169JR	1,0	0,9
112JR	1,1	1,2

(-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos.

Įvertinus abiejų metodų rezultatus, daugumoje atvejų, diskų metodo aktyvumas yra didesnis nei taško. Aktinobakterijų 5OH ir 8Mb izoliatų atveju, diskų metodo aktyvumas buvo didelis, o taško metodu – aktyvumas išvis nebuvo pastebėtas.

3.7.1. Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis *Candida parapsilosis* mielėms, tiriamas diskų metodu

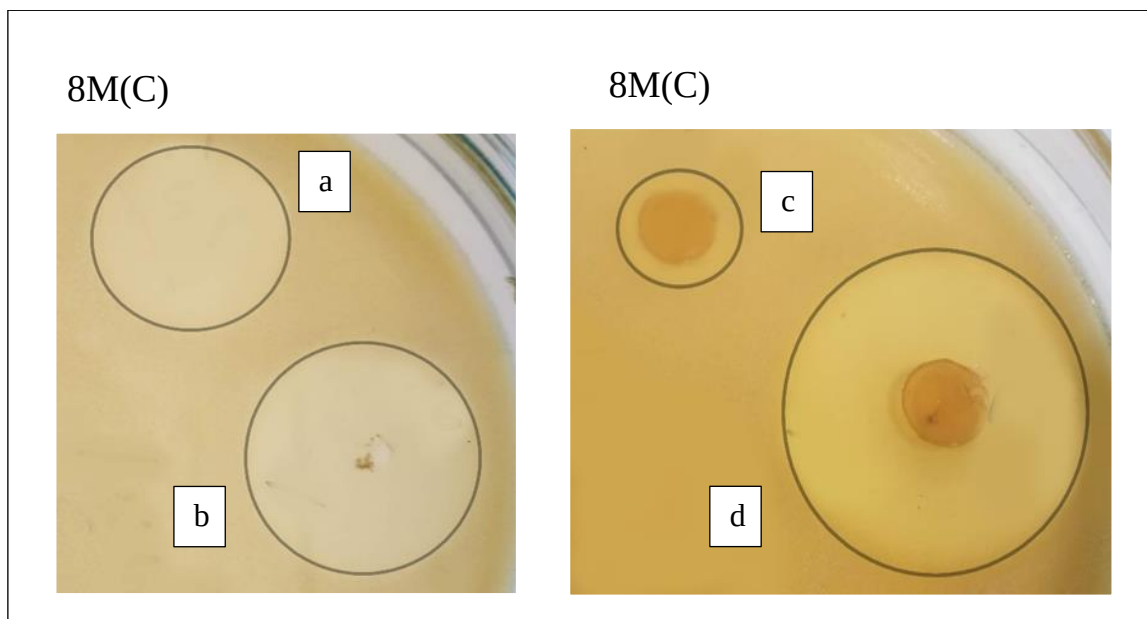
Tyrimų rezultatai parodė, kad diskų metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *C. parapsilosis* mielėms stipriausiu aktyvumu pasižymėjo 7Mb izoliatas, augęs mitybinėje terpėje pH 5 (inhibicinė zona 2,9 cm $\pm$ 0,1 cm) ir 7Mb izoliatas, augęs pH 6 terpėje (inhibicinė zona 2,5 cm $\pm$ 0,1 cm), taip pat 8M(C) izoliatas (3.7 pav.), augęs pH 6 terpėje (inhibicinė zona 2,6 cm $\pm$ 0,1 cm) (3.7.1 lentelė).

3.7.1 lentelė: Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, inhibicinių zonų dydžiai ant *C. parapsilosis* mielių gazono – diskų metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm$ 0,1 cm).

Aktinobakterijų izoliatai	pH reikšmės	
	pH 5	pH 6
	Inhibicinės zonos dydis, cm	
7Mb	2,9*	2,5
5.3g	0,8	0,8
5.4c	1,3	1,6
5.4d	1,4	1,5
8M(C)	0,9	2,6
5OH	-	-
213JR	0,7	0,7
8Mb	-	-
1OH	1,6	1,3
1K	-	-
12.B.1	1,2	1,1
12.B.2	0,7	0,7
160JR	-	-
107JR	-	-
192JR	0,8	0,8
114JR	-	-
216JR	-	-
169JR	0,9	-
112JR	1,0	-

* - įskaitant diską (0,7 cm). (-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos.

Ant *C. parapsilosis* gazono uždėjus diskus su aktinobakterijų kultūromis, 5OH, 8Mb, 1K, 160JR, 107JR, 114JR, 216JR izoliatai, bei 169JR ir 112JR izoliatai, augę pH 6 terpėje, neparodė jokio aktyvumo.



3.7. pav. Aktinobakterijų izoliato 8M(C), augusio skirtingose terpės pH reikšmėse taško metodo mėginiai: pH 5 – a, pH 6 – b; bei diskų metodo mėginiai: pH 5 – c; pH 6 – d; poveikis *C. parapsilosis* mielėms.

7Mb, 1OH ir 12.B.1 izoliatai (~ 16 %) buvo aktyvesni augę pH 5 terpėje, o 5.4c, 5.4d ir 8M(C) izoliatai (~ 16 %) – pH 6 terpėje.

3.7.2. Aktinobakterijų, kultivuočių skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis *Candida parapsilosis* mielėms, tiriamas taško metodu

Tyrimų rezultatai parodė, kad taško metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *C. parapsilosis* mielėms stipriausiu aktyvumu pasižymėjo 7Mb izoliatas, augęs pH 5 mitybinėje terpėje (inhibicinė zona $2,7 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$) ir 7Mb izoliatas, augęs pH 6 terpėje (inhibicinė zona $2,5 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$), bei 8M(C) izoliatas, augęs pH 6 terpėje (inhibicinė zona $2,3 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$) (3.7.2 lentelė).

Ant *C. parapsilosis* gazono taško metodu užnešus aktinobakterijų izoliatus, 5.4d, 5OH, 213JR, 8Mb, 1K, 12.B.1, 107JR, 192JR, 114JR, 216JR, 169JR ir 112JR izoliatai, bei 1OH izoliatas, augęs pH 6 terpėje, neparodė jokio aktyvumo. 7Mb, 5.3g ir 12.B.2 (~ 16 %) izoliatai buvo aktyvesni augę pH 5 terpėje, o 5.4c, 8M(C) ir 160JR (~ 16 %) izoliatai – pH 6 terpėje.

3.7.2 lentelė: Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, inhibicinių zonų dydžiai ant *C. parapsilosis* mielių gazono – taško metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm 0,1$ cm).

Aktinobakterijų izoliatai	pH reikšmės	
	pH 5	pH 6
	Inhibicinės zonos dydis, cm	
7Mb	2,7	2,5
5.3g	0,4	0,3
5.4c	0,8	1,2
5.4d	-	-
8M(C)	1,8	2,3
5OH	-	-
213JR	-	-
8Mb	-	-
1OH	1,8	-
1K	-	-
12.B.1	-	-
12.B.2	0,6	0,4
160JR	0,4	0,5
107JR	-	-
192JR	-	-
114JR	-	-
216JR	-	-
169JR	-	-
112JR	-	-

(-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos.

Aktinobakterijų antagonistinis aktyvumas priklausė nuo terpės pH reikšmės, tačiau 6 iš 19 (~ 32 %) bioaktyvių izoliatų poveikio *C. parapsilosis* mielėms išvis neparodė. Įvertinus abiejų metodų rezultatus, daugumoje atvejų, diskų metodo aktyvumas yra didesnis nei taško metodo bioaktyvumas, kuris kartais net neišreiškiamas, nors su diskų metodu inhibicinė zona yra pastebima (pvz. 213JR, 192JR, 112JR, 169JR izoliatai).

3.8.1. Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis *Candida albicans* mielėms, tiriamas diskų metodu

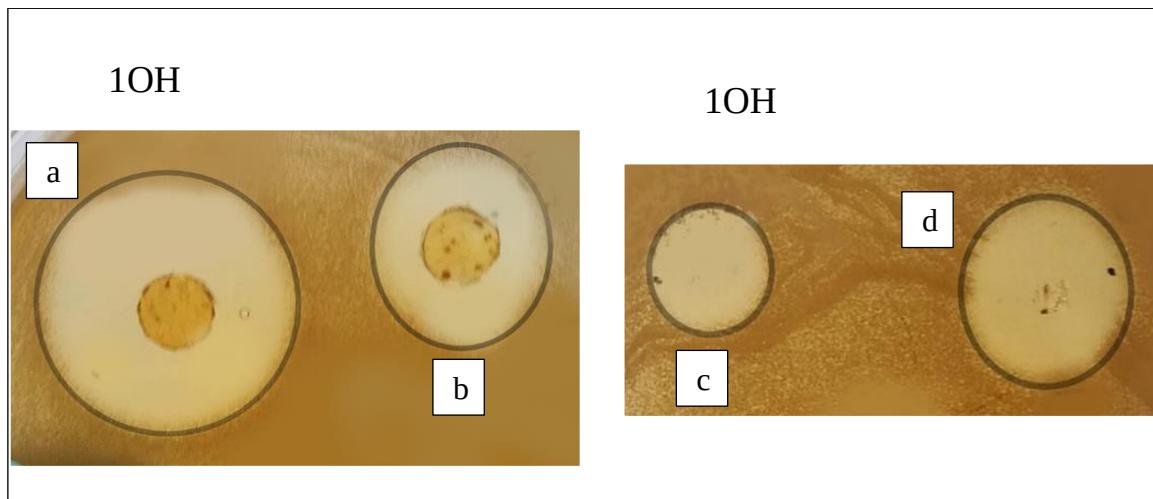
Tyrimų rezultatai parodė, kad disko metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *C. albicans* mielėms stipriausiu aktyvumu pasižymėjo aktinobakterijų 7Mb izoliatas, augęs mitybinėje pH 5 terpėje (inhibicinė zona 3,0 cm $\pm$ 0,1 cm) ir 7Mb izoliatas, augęs pH 6 terpėje (inhibicinė zona 3,1 cm $\pm$ 0,1 cm), taip pat 8M(C) izoliatas, augęs pH 6 terpėje (inhibicinė zona 3,0 cm $\pm$ 0,1 cm) ir 1OH izoliatas (3.8. pav.), augęs pH 5 terpėje (inhibicinė zona 2,8 cm $\pm$ 0,1 cm) (3.8.1 lentelė).

3.8.1 lentelė: Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, inhibicinių zonų dydžiai ant *C. albicans* mielių gazono – diskų metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm$ 0,1 cm).

Aktinobakterijų izoliatai	pH reikšmės	
	pH 5	pH 6
	Inhibicinės zonos dydis, cm	
7Mb	3,0*	3,1
5.3g	1,3	1,5
5.4c	2,1	1,8
5.4d	1,6	1,6
8M(C)	1,0	3,0
5OH	-	-
213JR	1,2	0,8
8Mb	-	-
1OH	2,8	2,0
1K	1,1	0,7
12.B.1	2,2	2,0
12.B.2	1,4	1,1
160JR	1,0	1,1
107JR	1,0	1,3
192JR	1,3	1,5
114JR	-	-
216JR	1,4	1,5
169JR	1,4	1,6
112JR	1,5	1,3

* - įskaitant diską (0,7 cm). (-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos.

Ant *C. albicans* gazono uždėjus terpės diskus su aktinobakterijų kultūromis, aktinobakterijų 5OH, 8Mb ir 114JR izoliatai neparodė jokio aktyvumo.



3.8. pav. Aktinobakterijų izoliato 1OH, augusio skirtingose pH reikšmėse diskų metodas: pH 5 – a, pH 6 – b terpėse; bei taško metodas: pH 5 – c; pH 6 – d; poveikis *C. albicans* mielėms.

5.4c, 213JR, 1OH, 1K, 12.B.1, 12.B.2 ir 112JR izoliatai (~ 37 %) pasižymėjo didesniu aktyvumu augę pH 5 terpėje, o 7Mb, 5.3g, 8M(C), 160JR, 107JR, 192JR, 216JR ir 169JR izoliatai (~ 42 %) – pH 6 terpėje.

3.8.2 Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produktojamų medžiagų poveikis *Candida albicans* mielėms, tiriamas taško metodu

Tyrimų rezultatai parodė, kad taško metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *C. albicans* mielėms stipriausiu aktyvumu pasižymėjo aktinobakterijų 7Mb izoliatas, augęs pH 5 terpėje (inhibicinė zona $2,7 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$) ir 7Mb izoliatas, augęs pH 6 terpėje (inhibicinė zona $2,8 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$) (3.8.2 lentelė).

Aktinobakterijų 5.4d, 5OH, 8Mb, 114JR, 160JR izoliatai, augę pH 5 terpėje, ir 192JR, 216JR bei 169JR izoliatai, augę pH 6 terpėje, neparodė jokio antagonistinio aktyvumo *C. albicans* mielėms. 213JR, 1K ir 12.B.2 izoliatai pasižymėjo didesniu aktyvumu augę mitybinėje pH 5 terpėje, o 7Mb, 5.3g, 5.4c, 8M(C), 1OH, 12.B.1, 107JR ir 112JR izoliatai – mitybinėje pH 6 terpėje.

3.8.2 lentelė: Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, inhibicinių zonų dydžiai ant *C. albicans* mielių gazono – taško metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm 0,1$ cm).

Aktinobakterijų izoliatai	pH reikšmės	
	pH 5	pH 6
	Inhibicinės zonos dydis, cm	
7Mb	2,7	2,8
5.3g	0,9	1,0
5.4c	1,3	1,6
5.4d	-	-
8M(C)	1,3	2,2
5OH	-	-
213JR	0,4	0,3
8Mb	-	-
1OH	0,9	1,3
1K	0,6	0,3
12.B.1	0,3	0,4
12.B.2	0,8	0,7
160JR	-	0,3
107JR	0,3	0,5
192JR	0,6	-
114JR	-	-
216JR	0,4	-
169JR	0,3	-
112JR	0,3	0,7

(-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos.

Aktinobakterijų antagonistinis aktyvumas priklausė nuo mitybinės terpės pH reikšmių, tačiau 3 iš 19 (~ 16 %) bioaktyvių izoliatų poveikio *C. albicans* mielėms išvis neparodė. Įvertinus abiejų metodų rezultatus, daugumoje atvejų, diskų metodo aktyvumas yra didesnis nei taško metodo.

3.9.1. Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis *Saccharomyces cerevisiae* mielėms, tiriamas diskų metodu

Tyrimų rezultatai parodė, kad diskų metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *S. cerevisiae* mielėms stipriausiu aktyvumu pasižymėjo aktinobakterijų 7Mb izoliatas, augęs mitybinėje pH 6 terpėje (inhibicinė zona 2,5 cm $\pm 0,1$ cm), 5OH izoliatas, augęs pH 5 terpėje (inhibicinė zona 2,7 cm $\pm 0,1$ cm) ir pH 6 terpėje (inhibicinė zona 2,4 cm $\pm 0,1$ cm), taip pat 8M(C) izoliatas, augęs pH 6 terpėje (inhibicinė zona 2,4 cm $\pm 0,1$ cm) ir 1OH izoliatas (3.8 pav.), augęs pH 5 terpėje (inhibicinė zona 2,5 cm $\pm 0,1$ cm) (3.9.1 lentelė).

3.9.1 lentelė: Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, inhibicinių zonų dydžiai ant *S. cerevisiae* mielių gazono – diskų metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm 0,1$ cm).

Aktinobakterijų izoliatai	pH reikšmės	
	pH 5	pH 6
	Inhibicinės zonos dydis, cm	
7Mb	2,3*	2,5
5.3g	1,8	1,7
5.4c	1,6	1,5
5.4d	1,6	1,3
8M(C)	1,6	2,4
5OH	2,7	2,4
213JR	1,2	1,0
8Mb	-	-
1OH	2,5	1,7
1K	1,7	1,4
12.B.1	1,9	1,9
12.B.2	1,7	1,9
160JR	1,1	1,2
107JR	1,1	1,4
192JR	1,7	1,4
114JR	1,3	1,0
216JR	1,2	1,4
169JR	1,8	1,9
112JR	1,8	1,4

* - įskaitant diską (0,7 cm). (-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos.

Iš visų tirtų aktinobakterijų izoliatų, tik 8Mb izoliatas neparodė jokio antagonistinio aktyvumo prieš *S. cerevisiae* mieles. Aktinobakterijų 5.3g, 5.4c, 5.4d, 5OH, 213JR, 1OH, 1K, 192JR, 114JR ir 112JR izoliatai (~ 53 %) pasižymėjo didesniu aktyvumu augę pH 5 mitybinėje terpėje, o 7Mb, 8M(C), 12.B.2, 160JR, 107JR, 216JR ir 169JR izoliatai (~ 37 %) – pH 6 terpėje.

3.9.2 Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, produkuojamų medžiagų poveikis *Saccharomyces cerevisiae* mielėms, tiriamas taško metodu

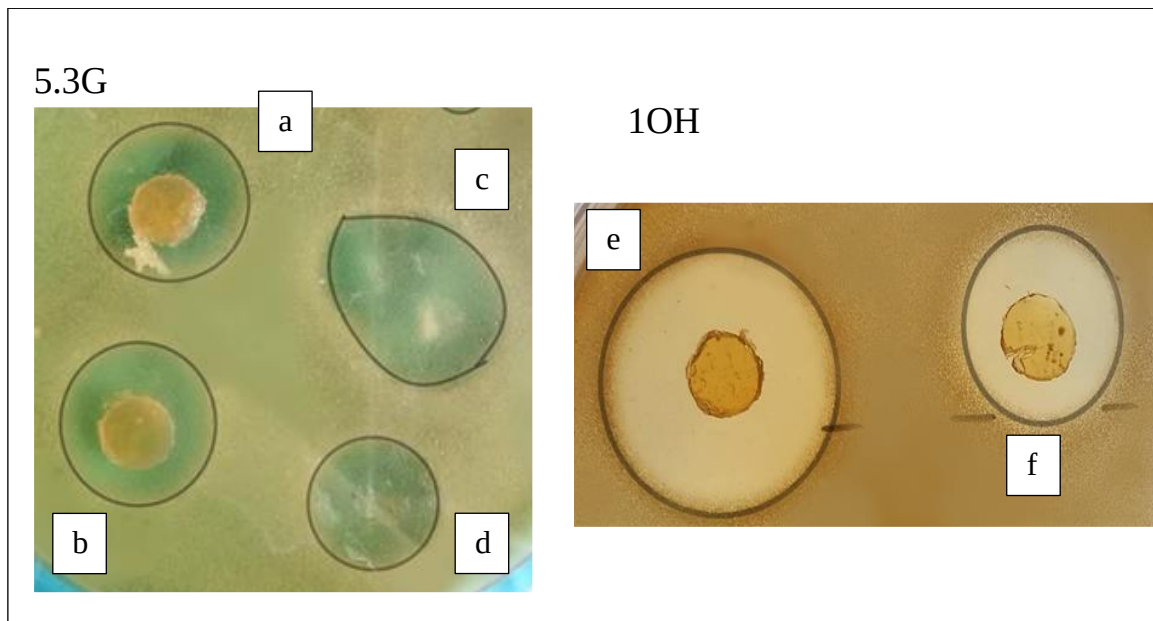
Tyrimų rezultatai parodė, kad taško metodu tiriant aktinobakterijų izoliatų poveikį *S. cerevisiae* gazonui stipriausiu aktyvumu pasižymėjo 7Mb izoliatas, augęs mitybinėje pH 5 terpėje (inhibicinė zona 1,8 cm $\pm 0,1$ cm) bei 5.3g izoliatas (3.9 pav.), augęs pH 5 terpėje (inhibicinė zona 1,7 cm $\pm 0,1$ cm) ir augęs pH 6 terpėje (inhibicinė zona 2,1 cm $\pm 0,1$ cm). Taip pat didelė inhibicinė zona pastebėta tiriant pH 5 ir pH 6 terpėse augusį 8M(C) izoliatą (inhibicinės zonos 1,7 cm $\pm 0,1$ cm ir 2,2 cm $\pm 0,1$ cm atitinkamai). 1OH izoliatas, augęs pH 5 terpėje, irgi išsiskyrė savo inhibicine zona – 1,7 cm $\pm 0,1$ cm. (3.9.2 lentelė).

3.9.2 lentelė: Aktinobakterijų, kultivuotų skirtingose pH reikšmėse, inhibicinių zonų dydžiai ant *S. cerevisiae* mielių gazono – taško metodas. Plačiausių inhibicinių zonų reikšmės paryškintos. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm 0,1$ cm).

Aktinobakterijų izoliatai	pH reikšmės	
	pH 5	pH 6
	Inhibicinės zonos dydis, cm	
7Mb	1,8	1,6
5.3g	1,7	2,1
5.4c	1,2	1,6
5.4d	0,8	0,4
8M(C)	1,7	2,2
5OH	-	-
213JR	0,8	0,9
8Mb	-	-
1OH	1,7	1,6
1K	-	-
12.B.1	1,3	1,3
12.B.2	0,7	0,9
160JR	0,6	0,5
107JR	0,3	1,0
192JR	-	-
114JR	-	-
216JR	0,6	0,4
169JR	0,4	0,5
112JR	0,8	0,9

(-) – aktinobakterijų izoliatas terpėje augo, tačiau produkuojamos antagonistinės medžiagos aktyvumo neparodė arba nebuvo išskiriamos.

Iš visų tirtų aktinobakterijų izoliatų, 5OH, 8Mb, 1K, 192JR ir 114JR izoliatai neparodė jokio antagonistinio aktyvumo prieš *S. cerevisiae* mieles. 7Mb, 5.4d, 1OH, 160JR ir 216JR izoliatai (~ 26 %) pasižymėjo didesniu aktyvumu augę pH 5 mitybinėje terpėje, o 5.3g, 5.4c, 8M(C), 213JR, 12.B.2, 107JR, 169JR ir 112JR izoliatai (~ 42 %) – pH 6 terpėje.



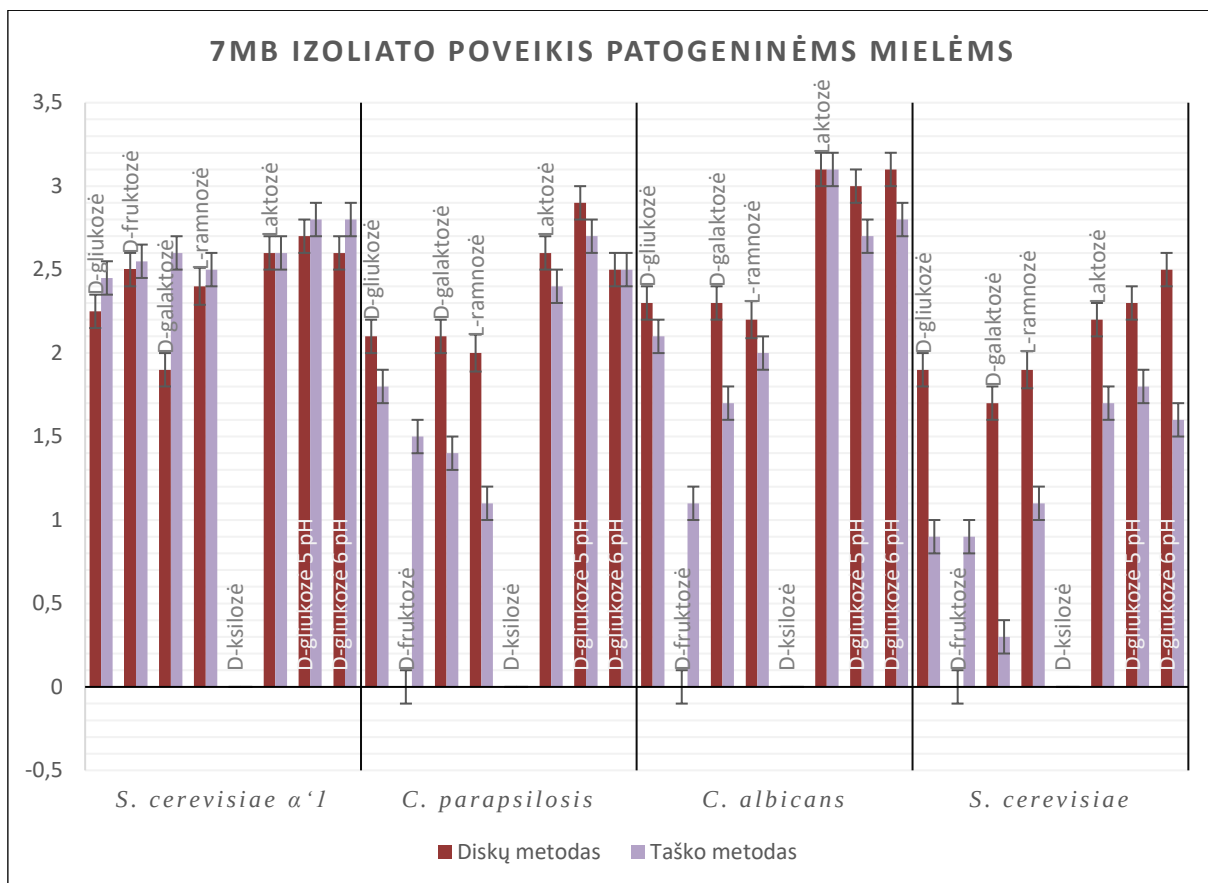
3.9. pav. Aktinobakterijų izoliato 5.3g, augusio skirtingose terpės pH reikšmėse diskų metodo: pH 6 – a, pH 5 – b; bei taško metodo mėginių: pH 6 – c, pH 5 – d; poveikis *S. cerevisiae* mielėms. Taip pat aktinobakterijų izoliato 1OH, augusio skirtingose terpės pH reikšmėse diskų metodo: pH 5 – e, pH 6 – f; poveikis *S. cerevisiae* mielėms.

Aktinobakterijų antagonistinis aktyvumas priklausė nuo mitybinės terpės pH reikšmės, tačiau 1 iš 19 (~ 5 %) bioaktyvių izoliatų (8Mb) poveikio *Saccharomyces cerevisiae* mielėms neparodė. Įvertinus abiejų metodų rezultatus, daugumoje atvejų, diskų metodo aktyvumas yra didesnis nei taško metodo.

3.10. Rezultatų aptarimas ir tolimesnės tyrimo kryptys

Gauti tyrimų rezultatai charakterizuoja atrinktus aktinobakterijų izoliatus 7Mb, 8M(C), 1OH, 1K, 5OH ir 5.3g kaip aktyviausius. Dėl išskiriamų medžiagų bioaktyvumo spektro ir gebėjimo augti ant skirtingų anglies šaltinių, šie aktinobakterijų izoliatai, o ypač 7Mb izoliatas, gali būti laikomi potencialiais antagonistinių medžiagų producentais. 7Mb aktinobakterijų izoliatas labiausiai veikė *C. albicans* mieles (3.10.1 pav.). Inhibicinių zonų intervalai: *S. cerevisiae* α'1: 1,9 cm – 2,8 cm; *C. parapsilosis*: 1,1 cm – 2,9 cm; *C. albicans*: 1,1 cm – 3,1 cm; *S. cerevisiae*: 0,3 cm – 2,5 cm. Toliau išsamiai tiriant šį izoliatą, jį identifikavus bei ištyrus išskiriamų medžiagų tipą ir jų savybes, galima taikyti įgytas žinias pramonėje.

Rezultatai patvirtina teorinėje dalyje apžvelgtus šaltinius – aktinobakterijos geba skaidyti bei įsisavinti įvairius anglies šaltinius ir nuo jų priklauso antrinių metabolitų išskyrimas. Be to, aukštesnis pH (pH 6) tinkamesnis aktinobakterijų augimui nei pH 5 ir palaiko didesnę izoliatų bioaktyvumą.

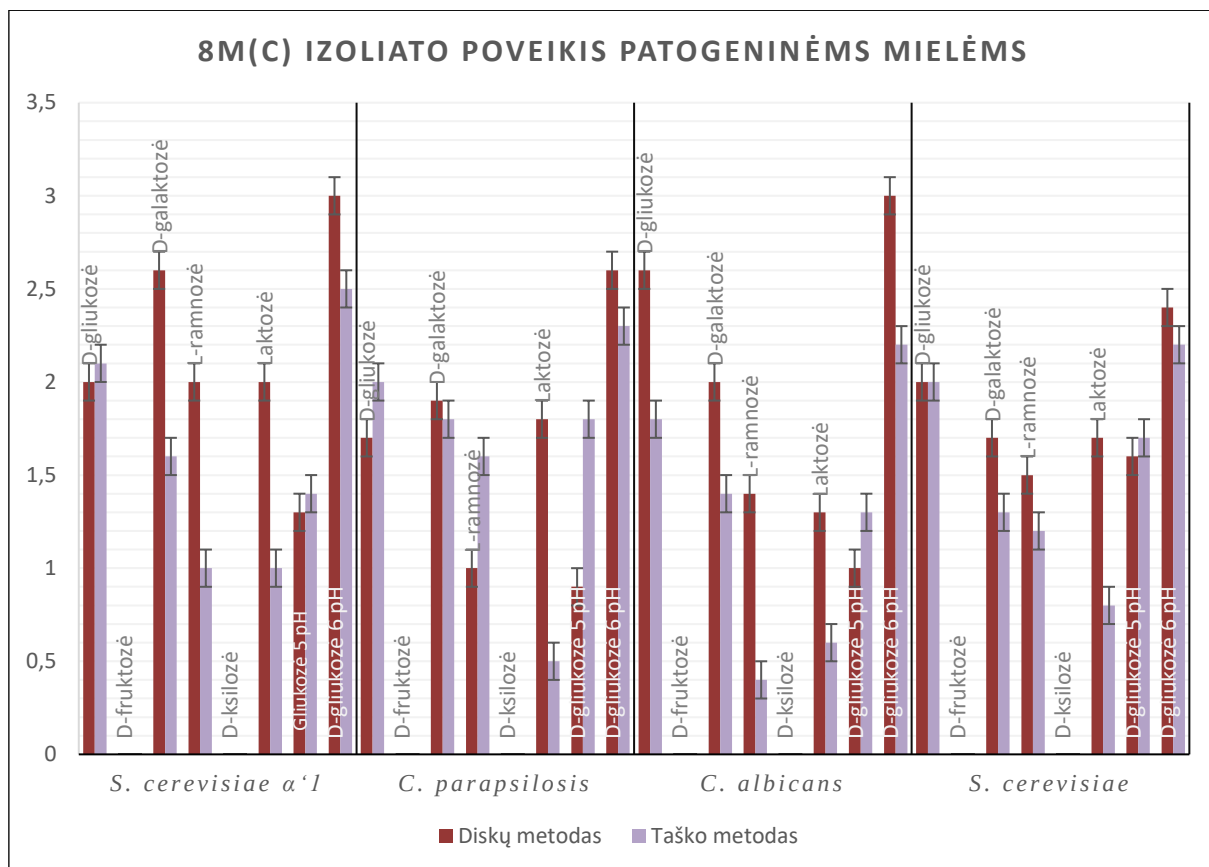


3.10.1 pav. Aktinobakterijų 7Mb izoliato poveikis patogeninėms mielėms. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm 0,1$ cm), paklaida parodyta vertikaliu brūkšniu.

Remiantis naudotais metodais parodyta, kad anglies šaltinis mitybinėje terpėje bei terpės pH reikšmė nulemia išskiriamų medžiagų bioaktyvumą, kiekį ar tipą. Šiais metodais taip pat galima remtis ieškant optimalių reikiamų antrinių metabolitų fermentacijos sąlygų tikrinant jau žinomus aktinobakterijų kamienus. Be to, galima tikrinti atrinktų aktyviausių aktinobakterijų izoliatų poveikį kitiems patogeniniams mikroorganizmams, pvz. MASA (meticilinui atspariam *Staphylococcus aureus*).

Aktinobakterijų 8M(C) izoliatas taip pat gali būti laikomas potencialiu antagonistinių medžiagų producentu (3.10.2 pav.). Šis aktinobakterijų izoliatas labiausiai veikė *S. cerevisiae α'1* ir *C. albicans* mieles. Inhibicinių zonų intervalai: *S. cerevisiae α'1*: 1,0 cm – 3,0 cm; *C. parapsilosis*: 0,5 cm – 2,6 cm; *C. albicans*: 0,4 cm – 3,0 cm; *S. cerevisiae*: 0,8 cm – 2,4 cm.

Tyrimų metu buvo surinkta nemažai rezultatų, tačiau buvo norima pasigilinti į izoliatų identifikaciją ir tarp tiriamų aktinobakterijų izoliatų paieškoti poli-L-lizino, antimikrobinio polimero, išskiriamo kai kurių aktinobakterijų, producentų. Taigi, šie aspektai ir galėtų būti tolimesnių tyrimų objektais.



3.10.2 pav. 8M(C) izoliato poveikis patogeninėms mielėms. Inhibicinių zonų reikšmės pateikiamos centimetrais ($\pm 0,1$ cm), paklaida parodyta vertikaliu brūkšniu.

Pirmiausia morfologiškai identifikavus izoliatą (pagal orinio, substratinio micelio spalvas, paviršių ir augimo sąlygas), būtų galima pasinaudoti GenBank ir kitomis duomenų bazėmis ir pasigilinti į izoliato taksonomiją. Esant galimybėms, pasinaudojus NDS-PAGE (baltymų elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis) ir PGR (polimerazės grandininės reakcijos) metodais, bei sudarius filogenetinį medį ir palyginus 16s rRNR sekas sekų suliginimo metodais, būtų galima identifikuoti tirtų aktinobakterijų rūšis.

Patikrinus duomenų bazes, pasigilinti į antimikrobinų medžiagų išskyrimą koduojančius genus, toliau optimizuoti išskiriamų antagonistinių medžiagų sąlygas ir esant trūkstamai informacijai apie optimalias augimo ar fermentacijos sąlygas duomenų bazėse jas papildyti. Auginant potencialus aktyviausius aktinobakterijų izolatus skystoje terpėje ir atskyrus reikiamus antrinius metabolitus, juos galima ištirti su dujų chromatografijos – masių spektrometrijos (GC-MS) bei ELISA (imunofermentinės analizės tyrimo) metodais, nustatyti išskiriamų medžiagų ir metabolitų struktūrą, molekulinę masę bei aktyvumo tipą. Surinkti duomenys leistų šiuos bioaktyvius izolatus panaudoti pramoniniams tikslams.

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad iš tiriamų 99 aktinobakterijų izoliatų, tik 19 jų yra bioaktyvūs (~ 19 %), t.y. produkuoja biologiškai aktyvias medžiagas. Stipriausiu antagonistiniu poveikiu pasižymėjo trys aktinobakterijų izoliatai: 7Mb, 8M(C) ir 1OH. Iš jų aktyviausias – 7Mb izoliatas, parodęs stiprų antagonistinį poveikį visoms tiriamoms patogeninėms mielėms.
2. Biologiškai aktyvias medžiagas išskiriantys aktinobakterijų izoliatai buvo sėkmingai kultivuoti skirtingų anglies šaltinių ir skirtingų pH reikšmių mitybinėje terpėje. Mitybinėje terpėje su D-fruktoze neaugo – 42 % (8 izoliatai), su D-ksiloze – 32 % (6 izoliatai), D-galaktoze – 26 % (5 izoliatai) ir L-ramnoze – 5 % (1 izoliatas).
3. Stipriausią antagonistinį poveikį patogeninėms mielėms parodė aktinobakterijų izoliatai, augę D-gliukozės ir laktozės mitybinėse terpėse.
4. Skirtingų pH reikšmių mitybinėse terpėse (pH 5 ir pH 6) augo visi tirti aktinobakterijų izoliatai. Nustatyta, kad daugiau tirtų aktinobakterijų izoliatų pasižymėjo stipresniu inhibiciniu poveikiu augdami mitybinėje terpėje esant pH 6 (~ 36 % izoliatų), nei pH 5 (~ 30 % izoliatų).
5. Įvertinus abiejų metodų rezultatus, daugumoje atvejų, diskų metodo aktyvumas yra didesnis nei taško metodo.
6. Aktinobakterijų antagonistinis aktyvumas patogeninėms mielėms priklauso nuo anglies šaltinio mitybinėje terpėje ir nuo mitybinės terpės pH reikšmės.

SANTRAUKA

Augustė Urbakonytė

Biologiškai aktyvias medžiagas produkuojančių aktinobakterijų poveikis patogeninėms mielėms

Vienos iš svarbiausių antibiotikus ir bioaktyvias medžiagas dirvožemyje išskiriančių bakterijų yra *Actinobacteria*. Tai filamentinės, Gram-teigiamos bakterijos, produkuojančios medicinoje, biotechnologijoje bei žemdirbystėje naudojamus antrinius metabolitus. Jų augimas ir antrinių metabolitų išskyrimas priklauso nuo terpės anglies šaltinio, pH reikšmės, azoto bei mineralinių medžiagų kiekio, aplinkos temperatūros ir kitų sąlygų. Modeliuojant aktinobakterijų kultivavimo sąlygas galima stebėti, kaip keičiasi jų antrinių metabolitų poveikis patogeniniams mikroorganizmams. Šio darbo metu aktinobakterijos buvo kultivuotos mitybinėje terpėje su įvairiais anglies šaltiniais bei skirtingų pH reikšmių terpėje, ir buvo įvertintas šių sąlygų veikiamas aktinobakterijų antagonistinis poveikis *S. cerevisiae* α' 1, *C. parapsilosis*, *C. albicans* bei *S. cerevisiae* mielėms. Atsitiktiniu būdu pasirinkus 99 aktinobakterijų izoliatus ir juos ištyrus, tik 19 izoliatų išskyrė bioaktyvias medžiagas. Toliau skirtingais metodais įvertinus šių bioaktyvių aktinobakterijų izoliatų produkuojamų medžiagų poveikį patogeninėms mielėms, nustatyta, kad stipriausiu antagonistiniu poveikiu pasižymėjo trys aktinobakterijų izoliatai: 7Mb, 8M(C) ir 1OH. Darbo metu naudojant du pagrindinius metodus pastebėta, jog diskų metodo aktyvumas yra didesnis nei taško metodo. Parodyta, kad aktinobakterijų antagonistinis aktyvumas tiriamoms mielėms priklausė nuo anglies šaltinio mitybinėje terpėje – D-gliukozės ir laktozės mitybinėse terpėse izoliatai augo geriausiai ir parodė stipriausią antagonistinį poveikį, o blogiausiai augo D-fruktozės ir D-ksilozės terpėse. Nors skirtingų pH reikšmių (pH 5 ir pH 6) gliukozės mitybinėje terpėje augo visi tirti aktinobakterijų izoliatai, nustatyta, jog jie išreiškė stipresnį inhibicinį poveikį augdami mitybinėje terpėje esant pH 6. Dėl išskiriamų medžiagų bioaktyvumo spektro ir gebėjimo augti ant skirtingų anglies šaltinių, bioaktyvūs aktinobakterijų izoliatai 7Mb, 8M(C) ir 1OH, o ypač 7Mb izoliatas, gali būti laikomi potencialiais antagonistinių medžiagų producentais. Juos identifikavus bei ištyrus išskiriamų medžiagų tipą ir jų savybes, galima taikyti įgytas žinias pramonėje.

SUMMARY

Augustė Urbakonytė

Antimicrobial Activity Evaluation of Actinobacteria Against Pathogenic Yeasts

One of the most significant soil-dwelling producers of antibiotics and bioactive metabolites are the *Actinobacteria*. They resemble filament microorganisms and are Gram-positive, and their secondary metabolites are used in medicine, biotechnology and agriculture fields. The growth of *Actinobacteria* and production of these metabolites depend on the carbon, nitrogen and mineral source used, as well as on the temperature and pH conditions. Changing the growth conditions results in a changed secondary metabolite production and antagonistic influence on pathogenic microorganisms. In this study, *Actinobacteria* were cultivated in mediums with different carbon sources and different pH values. Later on, the influence of these growth factors to the antimicrobial activity of *Actinobacteria* was tested on pathogenic yeasts *S. cerevisiae* α'1, *C. parapsilosis*, *C. albicans* and *S. cerevisiae*. 99 *Actinobacteria* isolates were picked at random and the results showed, that only 19 of them were bioactive. Different evaluation methods revealed that three *Actinobacteria* isolates – 7Mb, 8M(C) and 1OH exhibited the strongest antagonistic activity. Also, out of the two methods used the disc method was more effective than the spot inoculation method. It was proven that *Actinobacteria* antimicrobial activity depends on the medium carbon source – isolates grown in both D-glucose and lactose mediums were the most bioactive, while in the D-fructose and D-xylose mediums isolates were not growing well and did not exhibit much antagonistic activity. Though in both pH 5 and pH 6 D-glucose mediums *Actinobacteria* were growing well, pH 6 medium produced isolates with stronger inhibitory effects. Because of the selected *Actinobacteria* isolates' wide bioactivity spectrum and the ability to grow successfully on all carbon types, 7Mb, 8M(C) and 1OH isolates could be considered potential antagonistic metabolite producers. After identifying the *Actinobacteria* strains as well as the type and qualities of produced antimicrobials, these bioactive isolates could achieve high potential for industrial application.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Anandan, R., Dharumadurai, D., and Manogaran, G. P. (2016). An Introduction to *Actinobacteria*. *Actinobacteria* - Basics and Biotechnological Applications.
2. Antony, A. C. (2018). Megaloblastic Anemias, in: Ronald Hoffman M, Jr Benz EJ, Silberstein LE, Heslop H, Weitz J, Anastasi J, (Eds.), *Hematology: Edition Basic Principles and Practice*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Hematology, pp. 514–545.
3. Ashbee, R., and Bignell, E. M. (Eds.). (2010). *Pathogenic Yeasts*.
4. Atlas R. M., (2010). *Handbook of Microbiological Media*, third ed. CRC Press LLC, Boca Raton, 466 p.
5. Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Meier-Kolthoff J. P., Klenk H-P., Clément C., Ouhdouch Y., van Wezel G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 80(1), 1–43.
6. Bravo, A., Ruiz-Cruz, S., Alkorta, I., and Espinosa, M. (2018). When Humans Met Superbugs: Strategies to Tackle Bacterial Resistances to Antibiotics. *Biomolecular Concepts*, 9(1), 216–226.
7. Charousová, Ivana, Steinmetz, Heinrich, Medo, Juraj, Javoreková, Sona, and Wink, Joachim. (2016). Characterization of Antimycins – Producing Streptomycete Strain VY46 Isolated from Slovak Soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59, e16160274. Epub October 31, 2016.
8. Čitavičius D, Inge - Večtomov SG. (1972). Množestvennyje mutanty u drożdziej *Saccharomyces cerevisiae*. I. Polučenie i obščaja charakteristika. *Genetika*. 1, 95-102.
9. Das, R., Romi, W., Das, R., Sharma, H. K., and Thakur, D. (2018). Antimicrobial potentiality of *actinobacteria* isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. *BMC microbiology*, 18(1), 71.
10. Enache-Angoulvant, A., and Hennequin, C. (2005). Invasive *Saccharomyces* Infection: A Comprehensive Review. *Clinical Infectious Diseases*, 41(11), 1559–1568.
11. Escalante-Réndiz, D., de-la-Rosa-García, S., Tapia-Tussell, R., Martín, J., Reyes, F., Vicente, F., & Gamboa-Angulo, M. (2019). Molecular Identification of Selected *Streptomyces* Strains Isolated from Mexican Tropical Soils and their Anti-*Candida* Activity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11), 1913.
12. Flärdh, K., and Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 36–49.
13. Frankenfeld, C., Mittal, S., Melendez, Y., Mendez-Vigo, L., Lamp, K. C., Keller, K. N., and Bertolami, S. R. (2018). Daptomycin: a comparison of two intravenous formulations. *Drug design, development and therapy*, 12, 1953–1958.
14. Gauze G.F., Preobrazhenskaya T.P., Svesnikova M.A., Terekhova L.P. and Maximova T.S. (1983). Key to *Actinomycetes*. Nauka Publ, Moscow.

15. Graf W. D., Kekatpure M. V., and Kosofsky B. E. (2013). Prenatal-onset neurodevelopmental disorders secondary to toxins, nutritional deficiencies, and maternal illness. *Pediatric Neurology Part I*, 143–159.
16. Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M., and Fortas and Rebecca Pogni, Z. (2018). *Streptomyces* Secondary Metabolites. Basic Biology and Applications of *Actinobacteria*.
17. Hasani A., Kariminik A., Issazadeh K. (2014). *Streptomyces*: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. *Int J Adv Biol Biom Res*. 2(1):63-75.
18. Henkel M., and Hausmann R. (2019). Diversity and Classification of Microbial Surfactants. *Biobased Surfactants*, 41–63.
19. Hussein, E. I., Jacob, J. H., Shakhathreh, M., Al-Razaq, M., Juhmani, A. F., and Cornelison, C. T. (2018). Detection of antibiotic-producing *Actinobacteria* in the sediment and water of Ma'in thermal springs (Jordan). *Germes*, 8(4), 191–198.
20. Yi Jiang, Qinyuan Li, Xiu Chen and Chenglin Jiang (February 11th 2016). Isolation and Cultivation Methods of *Actinobacteria*, *Actinobacteria* - Basics and Biotechnological Applications, Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang, IntechOpen.
21. Janardhan, A., Kumar, A. P., Viswanath, B., Saigopal, D. V. R., and Narasimha, G. (2014). Production of Bioactive Compounds by *Actinomycetes* and Their Antioxidant Properties. *Biotechnology Research International*, 2014, 1–8.
22. Juttner, F., and Watson, S. B. (2007). Biochemical and Ecological Control of Geosmin and 2-Methylisoborneol in Source Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4395–4406.
23. Kemung HM, Tan LT-H, Khan TM, Chan K-G, Pusparajah P, Goh B-H and Lee L-H (2018) *Streptomyces* as a Prominent Resource of Future Anti-MRSA Drugs. *Front. Microbiol.* 9:2221.
24. Llopis, S., Hernández-Haro, C., Monteoliva, L., Querol, A., Molina, M., and Fernández-Espinar, M. T. (2014). Pathogenic potential of *Saccharomyces* strains isolated from dietary supplements. *PloS one*, 9(5), e98094.
25. LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [duomenų bazė internete]. Toulouse (Prancūzija): Jean P. Euzéby. Sukurta 1997 [žiūrėta 2020-03-30]. Adresas: <https://lpsn.dsmz.de/>
26. Martín J. F. (2004). Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *Journal of bacteriology*, 186(16), 5197–5201.
27. Naumova, T. I., Naumov, G.I. (1973). Sravnitel'naja genetika drozžej. Soobščenie XII. Izučenie antagonističeskikh otnošenij u drožžnej roda *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetika*. 9, 85-90.
28. Olanrewaju, O. S., and Babalola, O. O. (2019). *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(3), 1179–1188.
29. Pérez-Torrado, R., and Querol, A. (2016). Opportunistic Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: A Potential Risk Sold in Food Products. *Frontiers in microbiology*, 6, 1522.

30. Peterson, E., and Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 9, 2928.
31. Rafieenia, Razieh. (2013). Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in *Streptomyces*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences*. 3. 810-815.
32. Rangseekaew P., P.-Aree W. (2019). Cave *Actinobacteria* as Producers of Bioactive Metabolites.
33. Sardi, J. C. O., Mendes Giannini, M. J. S., Bernardi, T., Scorzoni, L., & Fusco-Almeida, A. M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1), 10–24.
34. Sehgal, S. (2003). Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplantation Proceedings*, 35(3), S7–S14.
35. Ser, H.-L., Tan, L. T.-H., Law, J. W.-F., Chan, K.-G., Duangjai, A., Saokaew, S., ... Lee, L.-H. (2017). Focused Review: Cytotoxic and Antioxidant Potentials of Mangrove-Derived *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*, 8.
36. Shaik, M., Girija Sankar, G., Iswarya, M., and Rajitha, P. (2017). Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 87–94.
37. Siddharth, Vittal, Wink, and Steinert. (2020). Diversity and Bioactive Potential of *Actinobacteria* from Unexplored Regions of Western Ghats, India. *Microorganisms*, 8(2), 225.
38. Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., and Rajnisz, A. (2012). Biologically active secondary metabolites from *Actinomycetes*. *Open Life Sciences*, 7(3).
39. Spampinato, C., and Leonardi, D. (2013). *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed research international*, 2013, 204237.
40. Taechowisan T., Lu C., Shen Y., Lumyong S., (2005). Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology*, 151(5), 1691–1695.
41. Thaker, M. N., Wang, W., Spanogiannopoulos, P., Waglechner, N., King, A. M., Medina, R., and Wright, G. D. (2013). Identifying producers of antibacterial compounds by screening for antibiotic resistance. *Nature Biotechnology*, 31(10), 922–927.
42. Trejo W. H., and Bennett R. E. (1963). *Streptomyces nodosus* sp. n., the amphotericin-producing organism. *Journal of bacteriology*, 85(2), 436–439.
43. Trofa, D., Gácsér, A., and Nosanchuk, J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 21(4), 606–625.
44. Van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., and van Wezel, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by *actinomycetes*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 392–416.
45. Vurukonda, S., Giovanardi, D., and Stefani, E. (2018). Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 952.

46. Wink J., Mohammadipanah F., Hamed J., (2017). Biology and biotechnology of *Actinobacteria*. Springer International Publishing AG, Cham, pp. 1-9, 29-39, 41-58, 125-129, 151-201, 282.

3.1.1. lentelė: Biologiškai aktyvias medžiagas produkuojančių aktinobakterijų paieška tiriant jų antagonistiskumą *S. cerevisiae* α'1 mielėms. (+) – aktinobakterijų izoliatas bioaktyvus, išskiria mielėms antagonistines medžiagas; (-) – bioaktyvių medžiagų išskyrimas nepastebėtas. Bioaktyvūs aktinobakterijų izoliatai paryškinti.

Aktino- bakterijų izoliatas	Bioaktyvių medžiagų išskyrimas	Aktino- bakterijų izoliatas	Bioaktyvių medžiagų išskyrimas	Aktino- bakterijų izoliatas	Bioaktyvių medžiagų išskyrimas
107JR	+	5OH.A	+	3.B	-
112JR	+	5.OH.B	-	3.C	-
114JR	+	5OH.D	-	3.D	-
144JR	-	5M.A	-	7.A	-
138JR	-	5M.B	-	7.B	-
160JR	+	6OH.A	-	7.C	-
169JR	+	6OH.B	-	7.D	-
192JR	+	7OH (B)	-	7.E	-
197.2JR	-	7OH (C)	-	7.F	-
213JR	+	7M.A	-	7.I	-
216JR	+	7M.B	-	8.A	-
217JR	-	8OH (B)	-	8.B	-
5.1-2c	-	8M.A	-	8.E	-
5.3g	+	8M.D	-	8.F	-
5.4c	+	L.M.b	-	8.G1	-
5.4d	+	1.A	-	8.H	-
5.4h	-	1.B	-	9.A	-
5Mb	-	1.C	-	9.B	-
7Mb	+	1.D	-	9.D	-
8.1 c	-	1.F	-	10.C	-
8.2b	-	1.G	-	10.D	-
8 org b	-	1.H	-	10.E	-
8 org c	-	1.I	-	11.B	-
8Mb	+	1.J	-	12.A	-
8M(C)	+	1K	+	12.B1	+
10H	+	1.L	-	12.B2	+
1M.A	-	2.A	-	12.C	-
1M.B	-	2.B	-	12.D	-
1M.C	-	2.C	-	13.F	-
1M.D	-	2.E	-	13.G	-
3M.A	-	2.F	-	13.H	-
3M.B	-	2.H	-	13.I	-
4OH (A)	-	3.A	-	13.J	-