

УДК579.23

К. М. КЕБЕКБАЕВА, А. К. ДЖОБУЛАЕВА, Л. П. ТРЕНОЖНИКОВА, А. Х. ХАСЕНОВА

ИЗУЧЕНИЕ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ СИНЕ-ФИОЛЕТОВОЙ ГРУППЫ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы

Дан анализ жизнеспособности и биологической активности актиномицетов сине-фиолетовой группы СФ ИМВ 20, 35, 44 после длительного хранения, подбор оптимальных условий биосинтеза.

Целью хранения актиномицетов является не только поддержание их жизнеспособности, но и сохранение основных свойств культур, а для продуцентов – биологически активных веществ – сохранение ценных свойств. Эта задача является достаточно трудной, так как актиномицеты, как и все микроорганизмы, легко меняют таксономические признаки в зависимости от условий и сроков культивирования. Хранение актиномицетов-продуцентов антибиотиков включает как стабилизацию культур, так и селекцию наиболее продуктивных вариантов. Селекционные исследования позволяют установить корреляцию между типами колоний, составляющих популяцию продуцентов и их биосинтетической активностью, что обеспечивает наряду со стабилизацией культур разработку эффективных методов хранения.

Возможность проведения разноплановых сравнительных исследований на колossalном разнообразии биологического материала представляет для экспериментатора как в фундаментальном, так и прикладном аспекте заманчивую и многообещающую перспективу. Однако необходимым условием осуществления такой возможности, безусловно, является сохранение на достаточно длительном отрезке времени жизнеспособности, таксономических свойств и физиологической активности штаммов микроорганизмов, составляющих нашу коллекцию, что свою очередь, невозможно без подбора соответствующих условий их консервации и последующей реактивации. Не случайно, проблема долгосрочного хранения микроорганизмов без утраты их свойства признана в качестве первостепенной во многих странах мира.

Материалы и методы

Жизнеспособность актиномицетов изучали посредством высева суспензий спор на ряд органических и синтетических сред, включая среды, состав которых соответствовал составу среды хранения. Для посевов были использованы как синтетические среды – минеральные агары 1 Гаузе и 3 Чапека, так и богатые органическими веществами агаровые среды – органический агар 2 Гаузе, картофельно-декстрозный агар, овсяный агар, пептонно-дрожжевой агар [1]. Определение выживаемости актиномицетов проводили путем вскрытия ампул с соблюдением правил стерильности и непосредственным высевом споровой взвеси на соответствующие агаровые среды и в пробирки с жидкими органическими средами для активации спор. Активацию спор проводили в термостате, а также путем культивирования на роторном шейкере (180-200 об\мин) при температуре 28°С в течение 3-5 суток. Морфологию спороносцев изучали в световом микроскопе МБИ 6 на агаризованных питательных средах после 14 дневной инкубации культур. Культуральные признаки актиномицетов изучали на следующих диагностических средах: минеральном агаре 1 Гаузе, органическом агаре 2 Гаузе, глицерин-нитратном агаре и овсяном агаре [2]. Для объективной оценки окраски использовали шкалу цветов А. С. Бондарцева [3]. Биосинтез антибиотиков осуществляли в колбах Эrlenmeyera вместимостью 750 мл в объеме среды 100 мл на круговой качалке (180-200 об\мин) при температуре 28° С в течение 72-96 часов.

Посевной материал выращивали на органической среде, содержащей (%): кукурузный экстракт (по сухому весу) – 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,35; NaCl – 0,5; CaCO₃ – 0,5; крахмал нерастворимый – 1,5; глюкоза – 1,0; pH 7,4-7,6. Измерение pH проводили на pH-метре марки Mettler Toledo MP220. Культуральную жидкость отделяли от мицелия центрифугированием при 2000 оборотов в течение

20 минут. Антибиотики выделяли отдельно из мицелия и нативного раствора штаммов-продуцентов экстракционным методом при pH 7: из культуральной жидкости – экстракцией Н-бутанолом и этилацетатом (3:1), из мицелия – ацетоном (1:3). Экстракты концентрировали в вакууме при температуре 40° С на роторном испарителе IKA RV 06-ML, водный остаток после удаления ацетона экстрагировали Н-бутанолом или этилацетатом. Экстракты вновь упаривали в вакууме до сухого остатка, и антибиотическое вещество растворяли в 96 % этаноле.

Антимикробную активность культуральной жидкости и ацетоновых экстрактов определяли стандартными методами: двухкратных серийных разведений на питательном бульоне и диффузии в агар на питательном агаре. Для определения активности в отношении *Candida albicans* и *Fusarium heterosporium* использовали среду Сабуро.

Спектры поглощения антибиотиков в УФ- и видимой областях света измеряли в бутаноле и 96 % этаноле на спектрофотометре “UltronSpec 2100 pro”.

Результаты и обсуждение

Объектами исследований являлись 3 штамма актиномицета (СФ ИМВ 20, 35, 44), заложенных на хранение в физиологическом растворе. Длительность хранения штаммов без пересева в коллекции Института микробиологии и вирусологии – 39 лет.

При выполнении данного исследования определены серии, к которым можно отнести штаммы актиномицетов, и изучена antimикробная активность, образуемых ими антибиотиков. Несмотря на высокую длительность хранения, жизнеспособность всех исследуемых штаммов актиномицетов сине-фиолетовой группы полностью восстановлена. Таким образом, способ хранения в физиологическом растворе обеспечивает сохранение культуральных свойств актиномицетов сине-фиолетовой группы и, что особенно важно, сохранение их antimикробных свойств. Проведен отбор штаммов, обладающих высокой продуктивностью антибиотического вещества и представляющих интерес для дальнейшего изучения.

Штамм СФ ИМВ 20. Длительность хранения штамма без пересева в коллекции Института микробиологии и вирусологии – 39 лет. На агаре 3 Чапека, овсяном агаре и органическом агаре 2 Гаузе жизнеспособность штамма СФ ИМВ 20 не проявляется. Штамм проявил умеренную способность к восстановлению на минеральном агаре 1 Гаузе и пептонно-дрожжевом агаре.

На дрожжевой среде рост штамма умеренный. Колонии одного типа – неправильной формы, складчатые, мягкой консистенции. Воздушный мицелий отсутствует, субстратный мицелий бесцветный. Растворимый пигмент не образуется.

На минеральном агаре 1 Гаузе рост хороший. Колонии одного типа – окружлой формы, плоские со слегка приподнятой серединой, хорошо опущенные. Воздушный мицелий телесно-фиолетовый, субстратный мицелий светло-серый. Растворимый пигмент не образует. Колонии со среды 1 Гаузе были отсеяны в чистую культуру, antimикробные свойства которой были изучены далее.

При росте штамма на синтетических и органических жидких средах не наблюдали появление темно-синей окраски культуральной жидкости. Antimикробная активность культуральной жидкости на испытанных средах либо отсутствует, либо очень незначительна. Данные по культуральным свойствам штамма СФ ИМВ 20, величине биомассы и антибиотической активности приведены в табл. 1.

Таблица 1. Культуральные свойства штамма 20 на жидких питательных средах

Наименование среды	Окраска культуральной жидкости	Окраска мицелия
Соевая А4	бежевая	бежевый
0,125% кукурузная	светло-желтая	белый
1 Гаузе	бледно-желтая	желтый
52/6	желтая	белый
Чапека-3 с глицерином	бесцветная	белый

Таблица 2. Антибиотическая активность культуральной жидкости штамма СФ ИМВ 20 на различных питательных средах

Наименование среды	Вес биомассы, г/л	Диаметр зоны подавления роста, мм		Активность, ед/мл, в отношении	
		<i>S. aureus</i> 209 Р	<i>K. pneumoniae</i> 444	<i>S. aureus</i> 209 Р	<i>K. pneumoniae</i> 444
Соевая А ₄	20,42	0	0	0	0
0,125% кукурузная	13,5	0	0	0	0
1 Гаузе	9,98	0	0	0	0
52/6	6,86	0	0	0	0
Чапека-3 с глицерином	2,95	10	0	0	0

На основании изучения культуральных признаков на диагностических средах штамм СФ ИМВ 20 отнесен к серии Fradiae. По совокупности культуральных свойства штамм СФ ИМВ 20 не может быть отнесен к группе сине-фиолетовых актиномицетов. Это объясняется, возможно, потерей признака образования пигмента при длительном хранении.

Штамм СФ ИМВ 35. Длительность хранения штамма без пересева в музее Института микробиологии и вирусологии – 39 лет. На минеральном агаре 1 Гаузе жизнеспособность штамма СФ ИМВ 35 не проявляется. Штамм проявил умеренную способность к восстановлению на органическом агаре 2 Гаузе, пептонно-дрожжевом агаре, агаре 3 Чапека и овсяном агаре.

На среде 3 Чапека рост умеренный. Колонии округлые, мелкие, не опущенные. Воздушный мицелий отсутствует, субстратный мицелий светло-серый. Растворимый пигмент отсутствует.

На органическом агаре 2 Гаузе рост очень слабый. Колонии неправильной формы, плоские, неопущенные, мягкой консистенции. Воздушный мицелий отсутствует, субстратный мицелий светло-коричневый. Растворимый пигмент отсутствует.

На пептонно-дрожжевом агаре рост слабый. Колонии мелкие, неправильной формы, неопущенные, мягкой консистенции. Воздушный мицелий отсутствует, субстратный мицелий светло-коричневый. Растворимый пигмент отсутствует.

На овсяном агаре рост хороший. Колонии одного типа – окружной формы, плоские, слегка приподнятые в центре, сильно складчатые, кратерообразные, хорошо опущенные. Воздушный мицелий светло-фиолетовый, субстратный мицелий коричнево-фиолетовый. Растворимый пигмент отсутствует. Колонии с овсяного агара были отсеяны в чистую культуру, антимикробные свойства которой были изучены далее.

При росте штамма на синтетических и органических жидких средах не наблюдали появление темно-синей окраски культуральной жидкости. Антимикробная активность культуральной жидкости в отношении *S. aureus*

209 Р изменяется на испытанных средах от 0 до 400 ед/мл, в отношении *K. pneumoniae* 444 от 0 до 800 ед/мл. Наиболее высокая активность наблюдалась на 0, 125% кукурузной среде. Данные по культуральным свойствам штамма СФ ИМВ 35, величине образования биомассы и антибиотической активности приведены в табл. 3-4.

На основании изучения культуральных признаков на диагностических средах штамм СФ ИМВ 35 отнесен к серии Lavendulae-roseus. Штамм СФ ИМВ 35 на основании изучения культуральных свойств не может быть отнесен к группе сине-фиолетовых актиномицетов. Возможно, это объясняется потерей признака образования пигмента при длительном хранении.

Таблица 3. Культуральные свойства штамма СФ ИМВ 1 на жидких питательных средах

Наименование среды	Окраска культуральной жидкости	Окраска мицелия
Соевая А4	коричневая	коричневый
0,125% кукурузная	светло-коричневая	бежевый
1 Гаузе	светло-коричневая	беловато-желтый
52/6	темно-коричневая	бежевый
Чапека-3 с глицерином	светло-сиреневая	сиренево-фиолетовый

Таблица 4. Антибиотическая активность культуральной жидкости штамма СФ ИМВ 35 на питательных различных средах

Наименование среды	Вес биомассы, г/л	Диаметр зоны подавления роста, мм		Активность, ед/мл, в отношении	
		<i>S. aureus</i> 209 Р	<i>K. pneumoniae</i> 444	<i>S. aureus</i> 209 Р	<i>K. pneumoniae</i> 444
Соевая А ₄		10	12	8	16
0,125% кукурузная		30	40	400	800
1 Гаузе		0	0	0	0
52/6		0	0	0	0
Чапека-3 с глицерином		12	14	16	20

Жизнеспособность штамма СФ ИМВ 35 восстановлена, биологические свойства изучены. Штамм образует антибиотическое вещество широкого спектра действия и может представлять интерес для дальнейшего изучения.

Штамм СФ ИМВ 44. Длительность хранения штамма без пересева в коллекции Института микробиологии и вирусологии – 39 лет. На минеральном агаре 1 Гаузе жизнеспособность штамма СФ ИМВ 35 не проявляется. Штамм проявил умеренную способность к восстановлению на органическом агаре 2 Гаузе, пептонно-дрожжевом агаре, агаре 3 Чапека и овсяном агаре.

На агаре 3 Чапека рост слабый. Колонии кожистые, слегка приподнятые, не опущенные. Субстратный мицелий светло-фиолетовый. Растворимый пигмент светло-фиолетовый.

На органическом агаре 2 Гаузе рост слабый. Все колонии одного типа - окружлой формы, плоские, слегка приподнятые, без воздушного мицелия. Субстратный мицелий телесно-розового цвета. Растворимый пигмент темно-фиолетовый.

На пептонно-дрожжевом агаре рост слабый. Колонии двух типов:

1) неправильной формы, с приподнятым центром, кожистые, складчатые, неопущенные. Субстратный мицелий розового цвета. Растворимый пигмент фиолетовый.

2) окружлой формы, плоские, неопущенные. Субстратный мицелий фиолетового цвета. Растворимый пигмент фиолетовый.

На овсяном агаре рост хороший, колонии двух типов:

1) окружлой формы, плоские, опущенные в центре. Воздушный мицелий беловато-серый. Субстратный мицелий розово-фиолетовый. Растворимый пигмент фиолетовый.

2) окружлой формы, слабо складчатые, хорошо опущенные в центре и слабее по краям. Воздушный мицелий беловато-серый. Субстратный мицелий розово-фиолетовый. Растворимый пигмент фиолетовый.

Проведен отсев всех вариантов в чистую культуру. При последующих пассажах установлена идентичность отсеванных вариантов по культурально-морфологическим свойствам на этих средах.

При росте штамма на синтетических и органических жидкостях наблюдали интенсивное появление темно-фиолетового пигмента. Антимикробная активность культуральной жидкости в отношении *S. aureus* 209 Р изменяется на испытанных средах от 600 до 12800 ед/мл. Наиболее высокая активность наблюдалась на 0,125% кукурузная среде. Данные по культуральным свойствам штамма СФ ИМВ 44, величине образования биомассы и антибиотической активности приведены в табл. 5-6.

Таблица 5. Культуральные свойства штамма СФ ИМВ 44 на жидкостных питательных средах

Наименование среды	Окраска культуральной жидкости	Окраска мицелия
Соевая А4	темно-фиолетовая	фиолетовый
0,125% кукурузная	темно-фиолетовая	фиолетовый
1 Гаузе	темно-фиолетовая	коричневый
52/6	темно-фиолетовая	темно-коричневый
Чапека-3 с глицерином	темно-фиолетовая	коричнево-фиолетовый

Таблица 6. Антибиотическая активность культуральной жидкости штамма СФ ИМВ 44 на различных питательных средах

Наименование среды	Вес биомассы, г/л	Диаметр зоны подавления роста, мм		Активность, ед/мл, в отношении	
		<i>S. aureus</i> 209 Р	<i>K. pneumoniae</i> 444	<i>S. aureus</i> 209 Р	<i>K. pneumoniae</i> 444
Соевая А ₄	10.73	42	36	3200	1600
0,125% кукурузная	1,81	58	50	12800	6400
1 Гаузе	0,5	32	23	800	400
52/6	0,5	30	22	600	400
Чапека-3 с глицерином	1,88	35	24	800	400

Изучены антимикробные свойства культуральной жидкости штамма СФ ИМВ 44 при ферментации на 0,125% кукурузная среде. Культуральная жидкость высокоактивна в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (рисунок 49): *S. aureus* 209 Р (зона подавления роста 58 мм), I вакцины Ценковского (зона подавления роста 48 мм), *Pasteurella multocida* (зона подавления роста 46 мм), *Klebsiella pneumoniae* 444 (зона подавления роста 50 мм), *Salmonella* sp. (зона подавления роста 47 мм) и неактивна против дрожжеподобных грибов *Candida albicans*.

На основании изучения культуральных признаков на диагностических средах штамм СФ ИМВ 44 отнесен к серии *Violaceus*. Штамм СФ ИМВ 44 восстановлен по характерным для группы сине-фиолетовых актиномицетов культуральным признакам и величине антибиотической активности. Штамм обладает высокой продуктивностью антибиотического вещества широкого спектра действия и представляет интерес для дальнейшего изучения.

При выполнении данного исследования определены серии, к которым можно отнести штаммы актиномицетов, и изучена антимикробная активность, образуемых ими антибиотиков. Несмотря на высокую длительность хранения, жизнеспособность всех исследуемых штаммов актиномицетов сине-фиолетовой группы полностью восстановлена. Таким образом, способ хранения в физиологическом растворе обеспечивает сохранение культуральных свойств актиномицетов сине-фиолетовой группы и, что особенно важно, сохранение их антимикробных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Гаузе Н.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. – М.: Наука, 1983. – 5 с.
- 2 Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 283 с.
- 3 Бондарцев А.С. Шкала цветов. – М.: АН СССР, 1954. – 31 с.

К. М. Кебекбаева, А. К. Джобулаева, Л. П. Треножникова, А. Х. Хасенова

АКТИНОМИЦЕТТЕРДІҢ КӨК-ҚЫЗЫЛТ ТОБЫНЫҢ ҰЗАҚ САҚТАУДАН КЕЙІНГІ ШТАМДАРЫН ЗЕРТТЕУ

Мақалада ұзак уақыт сактаудан кейінгі актиномицеттердің СФ ИМВ 20, 35, 44 көк-қызылт тобының тіршілікке қабілеттілігі және биологиялық белсенділігі, сонымен қатар биосинтезіне қолайлы жағдайларды тандал алу берілген.

Актиномицеттердің сактаудың маңызы, олардың тіршілікке қабілеттілігін қолдау ғана емес, сонымен қатар культуралардың жаңа қасиеттерін сактау, биологиялық белсенді заттардың продуценттері үшін экономикалық құнды қасиеттерін сактау. Бұл жұмыс аса қыын, себебі актиномицеттер, барлық микроорганизмдер сияқты, культуралау мерзіміне және жағдайларға байланысты өздерінің таксономикалық белгілерін онай өзгертерді. Актиномицеттердің сактау – культураларды тұрактандыру ретінде және өнімді жақсы беретін вариантардың селекциясы үшін антибиотиктердің продуценттерін қосады. Селекциялық зерттеулер культуралардың тұқытылығын қамтамасыз етумен қатар тиімді сактау әдістерін жасауды, олардың биосинтетикалық белсенділігін және продуценттердің популяциясын құрайтын, колониялар типтері арасындағы корреляцияны бекітуге мүмкіндік туғызады.

K. M. Kebekbaeva, A. K. Dzhobulayeva, L. P. Trenozhnikova, A. X. Hasanova

**ИЗУЧЕНИЕ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ СИНЕ-ФИОЛЕТОВОЙ ГРУППЫ
ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ**

The paper analyzes the viability and biological activity of actinomycetes of the blue-violet SF IMV 20, 35, 44, after prolonged storage, selection of optimal conditions for biosynthesis.

The purpose of storage of actinomycetes is not only the maintenance of viability, but also preservation of major crops, and for producers of biologically active substances, the preservation of economically valuable properties. This task is difficult enough, since actinomycetes, like all organisms, easily change the taxonomic characteristics, depending on the terms and conditions of cultivation. Storage of actinomycetes, producers of antibiotics include, as a stabilizing crops, and selection of the most productive options. Selection studies can establish a correlation between the types of colonies that make up the population of producers and their biosynthetic activity, which provides, together with the stabilization of cultural development of effective methods of storage.