

УДК 579.23

Л. П. ТРЕНОЖНИКОВА, А. ХАСЕНОВА, Г. С. МАХМУДОВА,  
К. М. КЕБЕКБАЕВА, А. К. ДЖОБУЛАЕВА

## ИЗУЧЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

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

Дан анализ изучение жизнеспособности и восстановление первоначальных культурально-морфологических признаков *S.roseolus* 1086, *S.violatus*, *A.antocyanus* 1016, находящихся на длительном хранении и заложенными различными способами. Целью хранения актиномицетов является не только поддержание их жизнеспособности, но и сохранение основных свойств культур, а для продуцентов биологически активных веществ-сохранение экономически 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.

Актиномицеты привлекают к себе большое внимание как продуценты биологически активных соединений, к которым относятся антибиотики, ферменты, витамины и другие вещества, широко используемые в настоящее время в медицине, сельском хозяйстве, пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства. Актиномицеты отличаются от бактерий повышенным разнообразием морфологии клеток. Причем, каждая популяция содержит клетки, отличающие не только морфологическими, но и многими биохимическими свойствами. Такая изменчивость позволяет быстро приспосабливаться к изменению условий среды и разным срокам хранения. Актиномицеты, как известно, характеризуются сильно выраженной вариабельностью [1]. Степень проявления процесса изменчивости зависит от генетической природы организма и условий внешней среды. Под действием обезвоживающего фактора погибают менее активные члены популяции, происходит как бы автоселекция в сторону повышения количественного соотношения активных вариантов. Иногда соотношение вариантов при лиофильном высушивании может оставаться почти неизменным. Как полагают, причина в высокой концентрации клеток в лиофилизированной суспензии спор. Для того чтобы располагать данными о характере и степени изменчивости каждого промышленного штамма, в первую очередь, мы хотели знать, как

изменяется жизнеспособность у членов популяции этого штамма под влиянием условий хранения.

### Материалы и методы

Жизнеспособность актиномицетов изучали посредством высеивания суспензий спор на минеральные агары 1 Гаузе и 3 Чапека, а также агаровые среды – органический агар 2 Гаузе, картофельно-декстрозный агар, овсяный агар, пептонно-дрожжевый агар [2]. При посеве штаммов актиномицетов, хранящихся на плотных средах и под вазелиновым маслом, споры петлей переносили в пробирки со стерильной жидкой органической средой и проводили их активацию. Активацию спор проводили в термостате, а также путем культивирования на роторном шейкере (180-200 об/мин) при температуре 28°C в течение 3-5 суток. Споровые взвеси высевали на агаровые среды и инкубировали в термостате при температуре 28°C в течение 14-21 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]. На диагностических средах отмечали цвет, характер и степень развития воздушного мицелия, окраску субстратного мицелия, наличие и окраску

растворимых пигментов. Для объективной оценки окраски использовали шкалу цветов А. С. Бондарцева [3]. Для получения спорового материала штаммы актиномицетов выращивали в течение 7-10 дней при температуре 28°C на минеральном агаре 1 Гаузе и органическом агаре 2 Гаузе.

### Результаты и обсуждение

В результате изучения жизнеспособности типовых штаммов актиномицетов были восстановлены культурально-морфологические свойства 3 штаммов: (*S.roseolus* 1086, *A.albocyanus*, *S.violatus*) *S. roseolus* 1086. Длительность хранения штамма без пересева в коллекции – 29 лет. Штамм проявил высокую способность к восстановлению на минеральном агаре 1 Гаузе и овсяном агаре. Восстановление штамма проведено без активации спор. При росте на минеральном агаре 1 Гаузе штамм образует розовый воздушный мицелий, желтовато-коричневатый субстратный мицелий. При росте штамма на овсяном агаре (рис. 1) наблюдало появление колоний округлой формы с неровными краями, хорошо опущенных. Воздушный мицелий кремово-розовый, субстратный мицелий желтовато-коричневатый.



Рис. 1. Культуральные признаки штамма *S. roseolus* 1086 на овсяном агаре, 10 сутки роста

Данные культуральные признаки являются характерными для этого вида серии *Lavendulae-Roseus* и соответствуют признакам исходного штамма. Форма спороносцев не изменяется..

*S. violatus*. Длительность хранения штамма без пересева в коллекции– 24 года. Штамм проявил слабую способность к восстановлению на

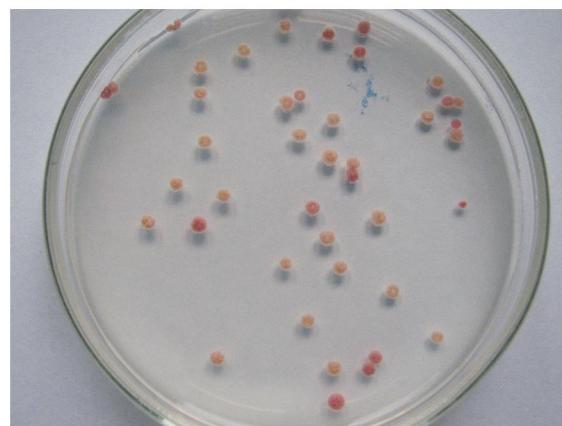


Рис. 2. Культуральные признаки штамма *S. violatus* на глицерин нитратном агаре, 10 сутки роста

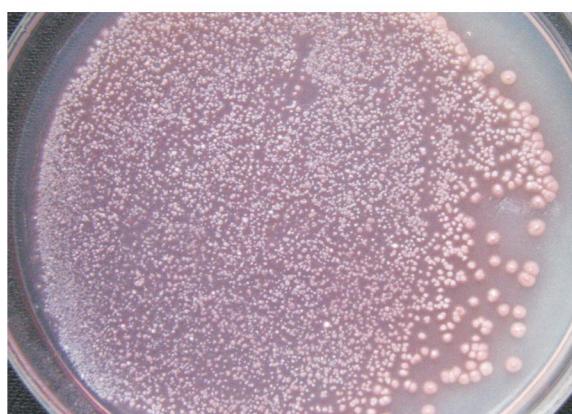
испытанных средах. Восстановление штамма проведено посредством активации спор на соевой среде А4. При первичных пассажах штамма наблюдали потерю способности образовывать воздушный мицелий и рост аспорогенных колоний (рис. 2). Были проделаны повторные пассажи через агаризованные и жидкие органические среды для восстановления спороношения штамма. При росте на минеральном агаре 1 Гаузе (рис. 3) и овсяном агаре штамм образует от беловато-розового до серовато-розового цвета воздушный мицелий, субстратный мицелий красно-фиолетовый. Растворимый пигмент красно-фиолетовый.



Рис. 3. Культуральные признаки штамма *S. violatus* на минеральном агаре 1 Гаузе, 7 сутки роста

На овсяном агаре (рис. 3) штамм образует колонии двух типов:

1) Колонии округлой формы, плоские, с выпуклой серединой. Воздушный мицелий светло-розовый, субстратный мицелий красно-фиолетовый. Растворимый пигмент красно-фиолетовый.



**Рис. 4.** Культуральные признаки восстановленного штамма *S. violatus* на овсяном агаре, 7 сутки роста

2) Колонии округлой формы, плоские, с выпуклой серединой, слабоопущенные. Воздушный мицелий белый, субстратный мицелий бесцветный. Растворимый пигмент отсутствует.

Проведен отсев колоний первого типа, имеющих характерные культуральные свойства для данного вида серии *Roseoviolaceus*. Все культурально-морфологические признаки восстановленной культуры соответствуют данным признакам исходного штамма. Форма спороносцев не изменяется.

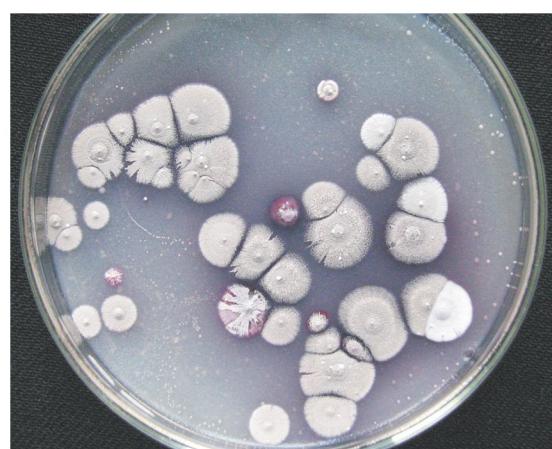
*S. antocyanus* 1016. Длительность хранения штамма без пересева в коллекции – 23 года. Штамм проявил слабую способность к восстановлению на испытанных средах. Восстановление штамма проведено с активацией спор на соевой среде А4.

При росте на минеральном агаре 1 Гаузе и овсяном агаре штамм образует розовый воздушный мицелий, субстратный мицелий от бледно-синего до темно-синего, фиолетового, красно-фиолетового. Растворимый пигмент бледно-синий, светло-фиолетовый. Для штамма характерна значительная вариабельность при рассеяхах.

На минеральном агаре 1 Гаузе штамм образует 4 типа колоний:

1) Колонии округлой формы, мелкие, хорошо опущенные. Воздушный мицелий розовый, субстратный мицелий синий. Растворимый пигмент бледно-синий.

2) Колонии округлой формы, плоские, в центре слегка приподнятые, мелкие, хорошо опущенные. Воздушный мицелий белый, субстратный мицелий фиолетовый. Растворимый пигмент бледно-синий.



**Рис. 5.** Культуральные признаки штамма *A.antocyanus* 1016 на овсяном агаре, 14 сутки роста

3) Колонии округлой формы, плоские, мелкие, хорошо опущенные. Воздушный мицелий серо-розовый, субстратный мицелий оранжево-красный. Растворимый пигмент бледно-синий.

4) Колонии округлой формы, плоские, мелкие, хорошо опущенные. Воздушный мицелий розовый, субстратный мицелий красно-фиолетовый. Растворимый пигмент бледно-синий.

Штамм *S. antocyanus* 1016 на овсяной среде (рис. 5) образует 4 типа колоний:

1) колонии округлой формы, с плоскими краями и приподнятой серединой в виде сосочки. Воздушный мицелий серо-фиолетовый, мучнистый; субстратный мицелий фиолетовый. Растворимый пигмент фиолетовый;

2) колонии округлой формы, с плоскими краями и приподнятой серединой в виде сосочки. Воздушный мицелий розовый, субстратный мицелий розово-фиолетовый. Растворимый пигмент фиолетовый;

3) колонии округлой формы, с плоскими краями и приподнятой серединой в виде сосочки. Воздушный мицелий светло-фиолетовый, субстратный мицелий красно-фиолетовый. Растворимый пигмент фиолетовый;

4) колонии округлой формы, с плоскими краями и приподнятой серединой в виде сосочки. Воздушный мицелий розовый, колонии опущены не полностью; субстратный мицелий фиолетовый. Растворимый пигмент фиолетовый.

На овсяном агаре была отмечена значительная вариабельность популяции штамма. Наблюдали появление секторных колоний, секторы не имели воздушного мицелия или были покрыты

очень скучным мицелием, в то время как осталась часть колоний имела хорошо развитый воздушный мицелий. Иногда мозаичный компонент располагался в центре колоний. Появление этого признака при изучении популяции штамма *A.antocyanus* 1016 после хранения отмечено М. Х. Шигаевой [4].

Проведен отсев колоний первого типа с минерального агара 1 Гаузе, имеющих характерные культуральные свойства для данного вида серии *Roseoviolaceus*. Все культурально-морфологические признаки восстановленной культуры соответствуют данным признакам исходного штамма. Форма спороносцев не изменяется.

В результате изучения жизнеспособности типовых штаммов актиномицетов были восстановлены культурально-морфологические свойства 3 штаммов (*S.roseolus* 1086, , *S.violatus*, *A.antocyanus* 1016). Изучены жизнеспособность и культурально-морфологические признаки 3 штаммов актиномицетов, продуцентов биологически активных веществ культур и их соответствие признакам исходно заложенных штаммов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Гаузе Н.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 5 с.
- Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. М.: Агропромиздат, 1990. 283 с.
- Бондарцев А.С. Шкала цветов. М.: АН СССР, 1954. 31 с.
- Шигаева М.Х. Изменчивость пигментных актиномицетов. Алма-Ата: Наука, 1968. 175 с.

#### Резюме

Ұзак уақыт сақтауда болған және әртүрлі әдістермен сақталынған *S.roseolus* 1086, *S.violatus*, *A.antocyanus* 1016 тіршілікке қабілеттілігін және біріншілік культуралы – морфологиялық белгілерін қайта қалпына келтірудегі зерттеулердің талдауы келтірлген. Актиномицеттердің сақтаудың маңсыты, олардың тіршілікке қабілеттілігін қолдау ғана емес, сонымен қатар культуралардың жаңа қасиеттерін сақтау, биологиялық белсенді заттардың продуценттері үшін экономикалық құнды қасиеттерін сақтау. Бұл жұмыс аса қызын, себебі актиномицеттер, барлық микроорганизмдер сияқты, культуралар мөрзіміне және жағдайларға байланысты өздерінің таксономикалық белгілерін өңдейтін өзгертуледі. Актиномицеттердің сақтау – культураларды тұрақтандыру ретінде және өнімді жақсы беретін вариантардың селекциясы үшін антибиотиктердің продуценттерін қосады. Селекциялық зерттеулер культуралардың тұқтылығын қамтамасыз етумен қатар тиімді сақтау әдістерін жасауды, олардың биосинтетикалық белсенділігін және продуценттердің популяциясын құрайтын, колониялар типтері арасындағы корреляцияны бекітуге мүмкіндік тузызады.

#### Summary

The article analyzes the study of the viability and regeneration of the original cultural and morphological characteristics *S.roseolus* 1086, *S.violatus*, *A.antocyanus* 1016, located on the long-term storage, and laid down in various ways. 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.