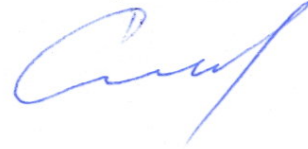


На правах рукописи



**Синёва Ольга Николаевна**

**ПОЧВЕННЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ РЕДКИХ РОДОВ: ВЫДЕЛЕНИЕ,  
АНТИБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ  
ХРАНЕНИЕ**

Специальность 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2020

Работа выполнена в лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»)

**Научный руководитель:**

**Терехова Лариса Петровна,**  
доктор биологических наук,  
заслуженный деятель науки РФ,  
профессор, ведущий научный  
сотрудник отдела микробиологии  
ФГБНУ «НИИНА»

**Официальные оппоненты:**

**Зенова Галина Михайловна,**  
доктор биологических наук, профессор,  
профессор кафедры биологии почв  
ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»

**Маркелова Наталья Николаевна,**  
кандидат биологических наук,  
научный сотрудник научно-исследовательского отдела  
молекулярной биологии и экспериментальной терапии  
опухолей ФГБУ "Российский научный центр рентгенорадиологии"  
Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение «Детский научно-клинический  
центр инфекционных болезней Федерального  
медико-биологического агентства»

Защита диссертации состоится «22» декабря 2020 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 001.005.01 при ФГБНУ «НИИНА» по адресу: 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11, стр.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИНА» и на сайте <https://www.gause-inst.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020

Приглашаем принять участие в обсуждении диссертации на заседании диссертационного совета.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
к.б.н.



О.В. Ефременкова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** На протяжении последних лет во всем мире наблюдается рост устойчивости патогенных микроорганизмов к существующим антимикробным препаратам. Проблема поиска новых антибиотиков становится все более актуальной. Большинство известных антибиотиков получено на основе природных метаболитов, синтезируемых микроорганизмами - бактериями и грибами [Berdy, 2005; Butler, Bass, 2006; Newman, Cragg 2007, Khanna et al., 2011, Newman, Cragg 2016]. Более 90% антимикробных препаратов, используемых в медицине, выделено из актиномицетов [Hamaki et al., 2005].

Актиномицеты - продуценты разнообразных по химическому строению биологических соединений, обладающих антибактериальным, противогрибковым и противоопухолевым действием. Большинство антибиотиков выделено из актиномицетов широко распространенного рода *Streptomyces*. Стрептомицеты являются быстрорастущими микроорганизмами, они легко выделяются из природных источников и просты в культивировании [Berdy, 2005; Khanna et al., 2011; Tiwari, Gupta, 2012]. В настоящее время внимание исследователей нацелено на выделение и изучение представителей редких родов актиномицетов, которые могут быть потенциальными продуцентами новых, еще не изученных антибиотиков. Методом метагеномного анализа показано, что в природных источниках находится огромное количество актиномицетов, однако для получения новых антибиотиков необходимо выделение продуцентов в чистую культуру. Для поиска и выделения актиномицетов редких родов разрабатываются новые методы выделения из природных источников - почвы, водоемов, растений. Установлено, что актиномицеты редких родов трудно выделяемы, растут медленнее, чем стрептомицеты, более требовательны к источникам питания, часто не культивируемы [Long et al., 1994; Zengler, 2005; Berdy, 2005; Hamaki et al., 2005, Balts, 2007, Bull et al., 2005; Bredholt et al., 2008; Okoro et al., 2009; Hop D.V., 2011; Tiwari, Gupta, 2012, Genilloud, 2017, Pratiwi, 2018]. В то же время, представители редких родов являются источником уникальных антибиотиков, таких как рифамицин (*Amycolatopsis mediterranei*), эритромицин (*Saccharopolyspora erythraea*), тейкопланин (*Actinoplanes teichomyceticus*), ванкомицин (*Amycolatopsis orientalis*), гентамицин (*Micromonospora purpurea*) и др. [Терехова и др., 1990; Berdy, 2005; Tiwari, Gupta, 2012].

После выделения актиномицетов в чистую культуру следует длительный процесс изучения новых культур и их метаболитов. На всех этапах изучения очень важно сохранить морфологические, физиологические и биохимические особенности микроорганизмов. Для этого разрабатываются методы длительного хранения культур, подбираются условия, позволяющие максимально сохранить биотехнологические свойства микроорганизмов. Выбор метода или разработка новых методов длительного хранения должны быть основаны на результатах исследований механизмов клеточных повреждений, возникающих в процессе консервации, а также на исследованиях механизмов сохранения микроорганизмов в мерзлотных почвах и ледниках. Известно, что главной причиной гибели клеток

при замораживании или оттаивании является повреждение мембран. Изучение фазово-структурной организации мембранных липидов (основных компонентов мембран) позволяет существенно расширить знания о причинах этих повреждений.

Таким образом, поиск новых продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов и сохранение в течение длительного времени выделенных культур без потери жизнеспособности и ценных свойств, таких как синтез биологически активных соединений, является актуальной проблемой современной науки.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы являлось: выделить из образцов дерново-подзолистой почвы и чернозема актиномицеты редких родов и изучить выживаемость и сохранение антибиотической активности выделенных культур и коллекционных штаммов актиномицетов при длительном хранении в условиях низких температур ( $-70^{\circ}\text{C}$ ).

В задачи исследования входило:

1. Разработать и обосновать метод низкотемпературного хранения актиномицетов путем изучения:

А) фазово-структурной организации фосфолипидных фракций клеточных мембран коллекционных культур актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06, используя метод дифракции рентгеновских лучей.

Б) влияния концентрации споровых суспензий на выживаемость данных коллекционных культур при длительном хранении при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

В) влияния криопротектора (10% раствора глицерина) на выживаемость и антибиотическую активность коллекционных культур при длительном хранении при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

2. Выделить из почвенных образцов культуры актиномицетов редких родов в целях создания коллекции для дальнейшего изучения, изучить их антибиотические свойства и определить таксономическое положение.

3. Изучить влияние сока *Aloe arborescens* на антибиотическую активность выделенных культур актиномицетов редких родов и коллекционных штаммов.

4. Заложить на хранение при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  выделенные культуры актиномицетов, изучить их жизнеспособность и сохранение антибиотической активности в течение длительного времени.

**Научная новизна.** Впервые методом дифракции рентгеновских лучей получена информация о фазово-структурной организации фосфолипидных фракций актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06. Показано, что клеточные мембраны *Str. hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup> более устойчивы к повреждающим факторам, чем клеточные мембраны *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06. На основании полученных данных проведено исследование влияния низкотемпературного замораживания на сохранение жизнеспособности данных культур и сохранение ими антибиотической активности в течение длительного времени. Установлено, что

при замораживании клеточных суспензий в концентрации  $10^5$ - $10^7$  КОЕ/мл коллекционные культуры сохраняют жизнеспособность, а также антибиотическую активность на высоком уровне. Показано, что 10% раствор глицерина (криопротектор) не оказывает влияния на выживаемость данных актиномицетов при хранении, высокую выживаемость культур обеспечивает высокая концентрация клеток в суспензии ( $10^5$ - $10^7$  КОЕ/мл). Показано, что при низких концентрациях клеток ( $10^2$  КОЕ/мл) в суспензии, сохраняет жизнеспособность лишь *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, культуры *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06 погибают.

Впервые установлено влияние сока алоэ (*Aloe arborescens*) на выделение актиномицетов редких родов. Показано, что при выдерживании почвенной суспензии с соком алоэ в течение 10 минут или 1 часа, увеличивается общее количество выделенных актиномицетов, при этом возрастает доля выделенных актиномицетов редких родов. Выделены в чистую культуру и изучены актиномицеты редких родов - *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinocorallia*, *Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Promicromonospora*, *Kribbella*. Показано, что сок алоэ оказывает не только ингибирующее действие на постороннюю микробиоту (грибы и немителиальные бактерии), но и стимулирует рост продуцентов и образование антибиотиков у некоторых культур актиномицетов, выделенных при добавлении сока алоэ в почвенную суспензию. Установлено, что спорообразующие актиномицеты редких родов способны сохранять высокую концентрацию жизнеспособных клеток в течение длительного времени при хранении методом низкотемпературного замораживания. Способность актиномицетов к синтезу антибиотиков не утрачивается.

**Практическая значимость.** Практическая значимость работы для микробиологии состоит в установлении зависимости фазово-структурной организации фосфолипидов клеточных мембран от качественного и количественного состава фосфолипидных фракций, уровня гидратации и времени хранения у разных видов актиномицетов. Полученные данные расширяют знания о процессах пространственной упорядоченности мембранных липидов и могут быть использованы для оптимизации условий хранения культур - продуцентов антибиотиков.

Установлено, что низкотемпературная консервация позволяет сохранять культуры актиномицетов в течение длительного времени без потери антибиотической активности. Данный метод может быть рекомендован для хранения культур актиномицетов.

Представлены и обоснованы рекомендации по использованию сока алоэ для увеличения количества и биоразнообразия актиномицетов редких родов при выделении их из почвы. Выявленное стимулирующее действие сока алоэ на синтез антибиотиков у штаммов-продуцентов позволяет использовать сок алоэ в качестве индуктора биосинтеза для некоторых культур актиномицетов.

Создана коллекция культур актиномицетов редких родов, которая насчитывает 101 штамм. Выделенные актиномицеты представляют интерес для

дальнейшего изучения с целью получения новых биологически активных соединений, а также в области фундаментальных исследований.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Информация о фазово-структурной организации фосфолипидных фракций клеточных мембран актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06, полученная методом дифракции рентгеновских лучей, позволяет установить различие в строении клеточных мембран данных актиномицетов, а также изменении основных физических параметров в процессе хранения.

2. Хранение коллекционных культур актиномицетов *Str. hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06 и выделенных культур актиномицетов редких родов в концентрациях  $10^5$ - $10^7$  КОЕ/мл в условиях низких температур ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) позволяет сохранить высокую жизнеспособность и антибиотическую активность культур без использования криопротектора в течение длительного времени.

3. Добавление сока алоэ в почвенные суспензии позволяет увеличить количество выделенных актиномицетов редких родов и оказывает стимулирующее действие на их рост и антибиотическую активность.

**Апробация работы.** Основные положения были представлены на Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии (Москва, 2012), Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012), III Международной научно-практической конференции «Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития». (Краснодар, 2013), VII Московском Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013), на XIII съезде товарищества микробиологов Украины им. С.Н. Виноградского (Ялта, 2013), Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни (Москва, 2014), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» - 2015» (Москва, 2015), IV Международной конференции «Микробное разнообразие. Ресурсный потенциал. Биотехнология и современность». ICOMID 2016 (Москва, 2016), IX Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017), на 1-м Российском микробиологическом конгрессе (Пушино, 2017), Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний» (Москва, 2018).

**Публикации.** По результатам исследований опубликовано 15 печатных работ, из них 4 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации результатов диссертационных работ.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 6-ти глав результатов исследований, обсуждения результатов, выводов, списка использованной литературы. Материалы диссертации изложены на 157 страницах, содержат 21 таблицу и 23 рисунка. Список литературы включает 197 источников.

### Объекты и методы исследования.

**Объекты исследования.** Образцы дерново-подзолистой почвы (образец №1, отобранный в г. Москве) и чернозема (образец №2, отобранный в Оренбургской области), отобранные в летний период из верхних горизонтов почвы. Для изучения влияния низкотемпературного замораживания на жизнеспособность и антибиотическую активность актиномицетов были отобраны культуры актиномицетов, выделенные из образцов почвы №1 и №2. Для изучения фазово-структурного состояния фосфолипидных фракций были отобраны следующие актиномицеты: *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *Nonomuraea roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06.

**Выделение актиномицетов из почвы с добавлением сока алоэ.** Срезанные листья алоэ древовидного (*Alôe arboréscens*) помещали в темное место при температуре +4<sup>0</sup>С на 10 дней. Листья обрабатывали 70% этиловым спиртом и разрезали на мелкие куски размером 1 см, затем отжимали сок через стерильную марлю. Свежевыжатый сок пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Полученный фильтрат добавляли в пробирку с дистиллированной стерильной водой, конечная концентрация сока алоэ составляла 10% и 50 %. Приготовление почвенных суспензий: 100 мг почвы тщательно растирали в фарфоровой ступке, затем помещали в пробирку с 10 миллилитрами стерильной дистиллированной воды, встряхивали на вортексе в течение 5 минут, отстаивали 30 секунд и отбирали для дальнейшего разведения 1 мл суспензии. Далее 1 мл суспензии помещали в пробирку с 9 мл смеси стерильной воды и сока алоэ. В контроль сок алоэ не добавляли. Пробирки с почвенными суспензиями настаивали в течение 10 минут и 1 часа. Высев производили стандартным методом поверхностного посева на питательные среды: овсяный агар и органический агар 2 Гаузе [Гаузе и др., 1983]. Инкубировали в термостате при температуре 28<sup>0</sup>С в течение 14 дней.

**Количественный учет выделенных актиномицетов и статистическую обработку** проводили с использованием методов математической статистики [Платонов, 2000] и программы Microsoft Inc., 2011.

**Определение таксономического положения выделенных культур актиномицетов.** Культуральные признаки определяли после инкубирования штаммов на овсяном агаре и среде №2 Гаузе. Фенотипические признаки изучали при помощи микроскопа OLIMPUS BX-41.

Анализ изомеров диаминопимелиновой кислоты (ДАПК) и анализ дифференцирующих сахаров в гидролизатах клеток определяли с помощью методов восходящей тонкослойной хроматографии в целлюлозном слое [Lechevalier et al., 1971]. Разделение проводили сахаров проводили в системе: бензол: бутанол: пиридин: вода (10:50:30:30) [Gaillard, 1953].

Выделение ДНК проводили согласно методике Манучаровой Н.А. [Манучарова, 2010], используя набор для выделения Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, США).

Для проведения полимеразной цепной реакции использовали праймеры: 27f и 1492r фирмы «СИНТОЛ» (Россия), Амплификацию проводили на

автоматическом амплификаторе 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США, используя набор реагентов фирмы «Thermo Fisher Scientific» (США)).

Для определения нуклеотидной последовательности использовали праймеры: 27f, 341f, 785f, 1495r фирмы «СИНТОЛ» (Россия). Реакцию секвенирования проводили на автоматическом амплификаторе 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США). Секвенирование проводили на автоматическом капиллярном секвенаторе 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США) с использованием реагентов BigDye Terminator v3 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), в соответствии с рекомендациями производителя. Идентификацию актиномицетов осуществляли методом сравнения нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагментов генов 16S рРНК с последовательностями, представленными в базе данных GenBank NCBI по протоколу nBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>). Редактирование последовательностей проводили в редакторе BioEdit, множественное выравнивание и построение филогенетических деревьев с использованием программы MEGA 6.

#### **Выделение фосфолипидных фракций из мембран актиномицетов.**

Для получения биомассы актиномицеты (*N. roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06 и *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>) выращивали на жидкой органической среде №2 Гаузе. Мицелий осаждали центрифугированием при 4000 об/мин (центрифуга Eppendorf 5702, Германия), затем промывали буферным раствором, содержащим 20мМ трис-НСl и 2мМ ЭДТА, рН=7,0. В качестве лизирующего агента использовали лизоцим марки Б (Реахим, Россия) в концентрации 4-5 мг/мл. Для разрушения белков использовали проназу 250 мкг/мл (Синтол, Россия), затем добавляли ДНКазу и РНКазу (Синтол, Россия) в концентрации 10 мкг/мл. Мембранную фракцию получали центрифугированием при 22000 об/мин в течение 30 минут на центрифуге Beckman (США). Чистоту препаратов мембранных фракций проверяли при помощи фазово-контрастной и электронной микроскопии (JEM 100CXII, JEOL, Япония). Липидную фракцию выделяли, используя методику О'Доннелла с соавторами [O'Donnell et al., 1985].

**Определение компонентов фосфолипидных фракций.** Основные компоненты фосфолипидных фракций определяли с помощью одномерной тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» (Чехия) в системе растворителей хлороформ: метанол: вода (65:30:5) и двумерной ТСХ в двух системах растворителей хлороформ: метанол: вода (65:25:4) и хлороформ : метанол : 25% аммиак (6:25:5) на пластинках «Merck» (Германия) и «Silufol» (Чехия) на стеклянной основе. В качестве контроля использовали препараты фосфолипидов: фосфатидилглицерин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилинозит и фосфатидилсерин фирмы «Sigma» (США). Хроматограммы проявляли 5% раствором фосфорномолибденовой кислоты в этаноле, 0.2% раствором нингидрина в этаноле, реактивом Шиффа. Количественный анализ фосфолипидов проводили методом сканирования хроматограммы на сканере «Epson Perfection 3490 PHOTO» (Япония) с использованием программы «Digital». Процентное



содержание фосфолипидов оценивали по интенсивности окраски соответствующих зон относительно их суммы.

**Измерение дифракционных спектров.** Для дифракционных измерений использовали образцы липидных фракций актиномицетов с разным уровнем гидратации – липиды, частично гидратированные парами воды из воздуха и в избытке воды. Образцы фосфолипидов, выделенные из мембран актиномицетов, помещали в кварцевые капилляры диаметром 1.5 мм и толщиной стенки 0.01 мм (GLAS, Германия). Измерение дифракционных спектров проводили на установке «Дикси» синхротронного источника Сибирь-2 РНЦ «Курчатовский институт» при комнатной температуре на расстоянии образец – детектор  $L_{sd} = 271$  мм и длине волны фотона 1,63 Å. Расчеты параметров структур, образованных липидами фосфолипидных фракций актинобактерий, проводили ранее описанными методами [Киселев и др., 2010; Киселев, 2011]:

**Изучение антагонистических свойств актиномицетов.** Антибиотические свойства выделенных культур актиномицетов проверяли двумя методами: методом перпендикулярных штрихов на органическом агаре №2 Гаузе и методом диффузии антибиотика в агар [Егоров Н.С., 1986]. При глубинном культивировании использовали следующие среды: органическая среда 2 Гаузе, среда А4, среда 330, среда 6613, среда 2663, среда 5339, сахарозная среда. В качестве тест-организмов использовали культуры: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042.

**Изучение влияния адреналина, сока алоэ древовидного и тест-микроорганизмов на антибиотическую активность выделенных актиномицетов.** «Адреналин (эпинефрин)» (Московский эндокринный завод, Россия) в концентрации 0,5, 1,0, 1,5 мкг/мл вносили в колбы с жидкими питательными средами, предварительно засеянные культурами актиномицетов. Сок алоэ древовидного вносили в колбы с жидкими питательными средами, предварительно засеянными культурами актиномицетов. Концентрация сока алоэ составляла 5%, 10%. Для изучения влияния тест-микроорганизмов на антибиотическую активность актиномицетов, использовали следующие культуры: *S. aureus* ИНА 00762 и *M. luteus* ATCC 9341. К молодой культуре актиномицета, выращенной в жидкой среде в течение 48 часов добавляли убитые автоклавированием тест-микроорганизмы в количестве 10 мл на 100 мл среды (концентрация  $10^6$  КОЕ/мл) и живые культуры *M. luteus* ATCC 9341 в количестве 1 мл на 100 мл среды (концентрация инокулята  $10^6$  КОЕ/мл).

**Изучение влияния низкотемпературного замораживания на выживаемость и сохранение антибиотических свойств актиномицетов.** Культуры актиномицетов выращивали в пробирках на агаризованной овсяной среде при температуре 28<sup>0</sup>С до стационарной фазы роста. Затем споры смывали стерильной дистиллированной водой. Полученные суспензии отфильтровывали через стерильный бумажный фильтр «Ф» ГОСТ 12026-76 ОАО «Химмед» (Россия) и разливали в криопробирки объемом 2 мл «Greiner bio-one» (Германия). Часть

суспензий замораживали в дистиллированной воде без использования криопротектора, другую часть в присутствии криопротектора - 10% раствора глицерина «Реахим» (Россия). Замораживание и хранение образцов проводилось в низкотемпературном морозильнике Revco «Thermo Scientific» (США) при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Процесс восстановления замороженных культур осуществлялся путем оттаивания при комнатной температуре. Количество жизнеспособных клеток определяли методом подсчета КОЕ после высева проб на чашки Петри с агаровой средой №2 Гаузе. Изучение выживаемости штаммов актиномицетов *N. roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06 и *Str. hygroscopicus* RIA 1433 при различных концентрациях спорных суспензий проводили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ , суспензии были использованы в следующих концентрациях:  $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  КОЕ/мл.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Изучение фазово – структурной организации фосфолипидной фракции клеточных мембран актиномицетов

Изучение состава липидных фракций клеточных мембран актиномицетов показало, что преобладающим компонентами фосфолипидной фракции *Str. hygroscopicus* RIA 1433 являются: фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит и фосфатидилсерин, преобладающими компонентами у *N. roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281 - фосфатидилэтаноламин, у *Streptosporangium* sp. INA 34-06 - фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин.

Дифракционный спектр фосфолипидной фракции культуры *Str. hygroscopicus* RIA 1433, частично гидратированной парами воды из воздуха, представлен на рисунке 1.

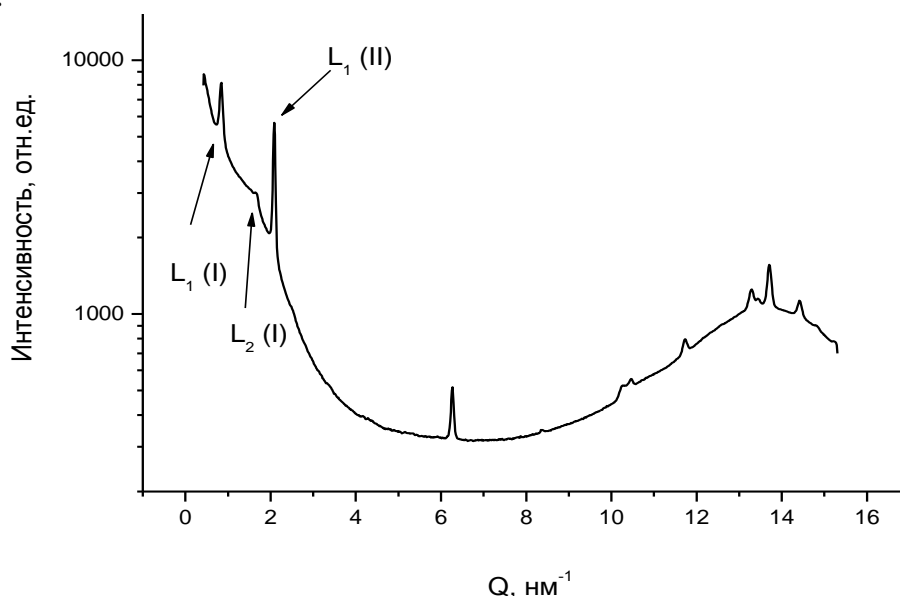


Рис.1. Дифракционный спектр от ламеллярной ( $q < 6 \text{ нм}^{-1}$ ) и латеральной ( $q \approx 1.5 \text{ нм}^{-1}$ ) структуры многослойных агрегатов частично гидратированной фосфолипидной фракции *Str. hygroscopicus* RIA 1433T: Q - вектор рассеяния;  $L_1$  (I),  $L_2$  (I),  $L_1$ (II)- пики первого и второго порядка двух ламеллярных фаз липидов фракции.

Расположение пиков спектра позволяет говорить о том, что липиды находятся в двух фазовых состояниях: L(I) и L(II) ламеллярной конфигурации. Период повторяемости пика второй ламеллярной фазы L(II)  $d_2=3$  нм. Исходя из полученных данных, следует, что в условиях дефицита воды липиды фосфолипидной фракции *Str. hygrosopicus* RIA 1433 образуют мультисамеллярные слои довольно плотной упаковки.

Известно, что показателем стабильности самоорганизующихся липидных структур и их термодинамического равновесия может служить обратимость процесса их образования при нагревании и охлаждении [Ефимова и др., 1977]. Наши исследования показали, что при нагревании образца частично гидратированной фосфолипидной фракции *Str. hygrosopicus* RIA 1433 до температуры 60°C происходит его деструктуризация. Измерение дифракционных спектров после охлаждения образца до 25°C показало, что первоначальная структура фосфолипидной фракции не восстановилась. После 10 месяцев хранения образца при +4°C было проведено повторное измерение спектров, которое показало, что фосфолипидная фракция *Str. hygrosopicus* полностью восстановила свою структуру.

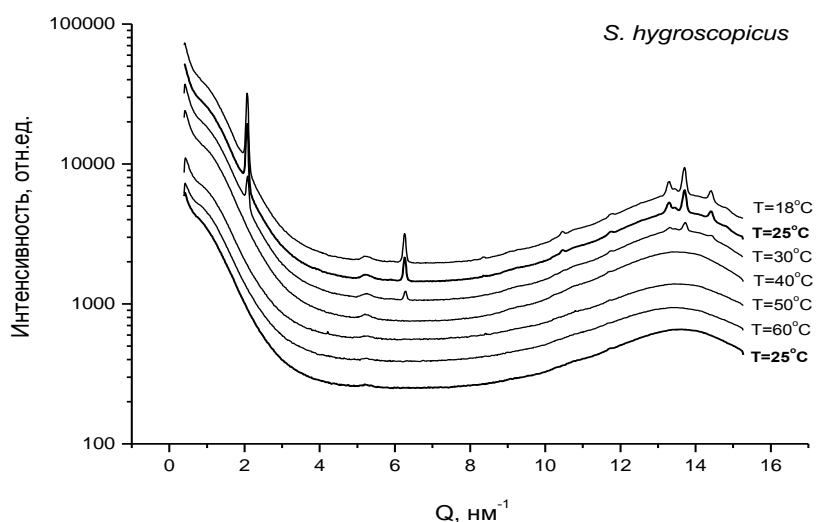


Рис.2. Изменение дифракционной картины от образца частично гидратированной фосфолипидной фракции *Str. hygrosopicus* RIA 1433 при нагревании от 18°C до 60°C и последующем охлаждении до 25°C.

Дифракционные спектры, частично гидратированной парами воды из воздуха, фосфолипидной фракции культуры *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 (рис. 3) показали наличие инвертированной гексагональной (HII) фазы. Параметр  $\alpha$  гексагональной структуры (расстояние между центрами цилиндров) равен 4.66 нм. При повторном измерении дифракционного спектра через две недели, значение параметра  $\alpha$  изменилось до 4.93 нм. Эти данные свидетельствуют о том, что структура липидов нестабильна – расстояние между центрами цилиндров и размеры самих цилиндров, меняются с течением времени.

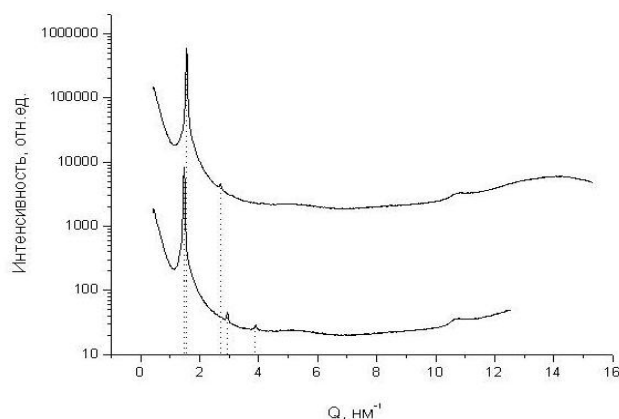


Рис.3. Дифракционные спектры от частично гидратированной фосфолипидной фракции *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281. Пунктиром показаны пики от инвертированной гексагональной структуры (ИГ).

Наши исследования показали, что липиды фосфолипидной фракции *Streptosporangium* sp. INA 34-06 при недостатке воды находятся в двух фазовых состояниях – ламеллярной и инвертированной гексагональной (ИГ) (рис.4,5). Расположение пиков ламеллярной жидкокристаллической фазы указывает на образование липидами многослойной мембраны с периодом повторяемости  $d = 5.07$  нм. Параметр  $a$  гексагональной структуры (расстояние между центрами цилиндров) равен 5.60 нм.

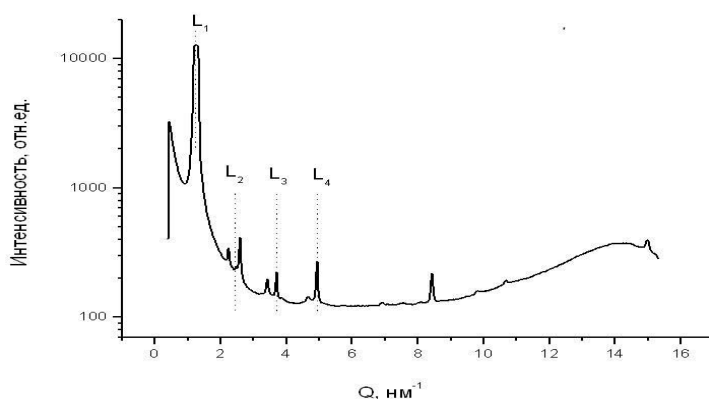


Рис. 4. Дифракционный спектр от частично гидратированной фосфолипидной фракции *Streptosporangium* sp. INA 34-06. А. – пики ( $L_i$ ) от ламеллярной структуры жидкокристаллической фазы ( $i$  - порядок отражения).

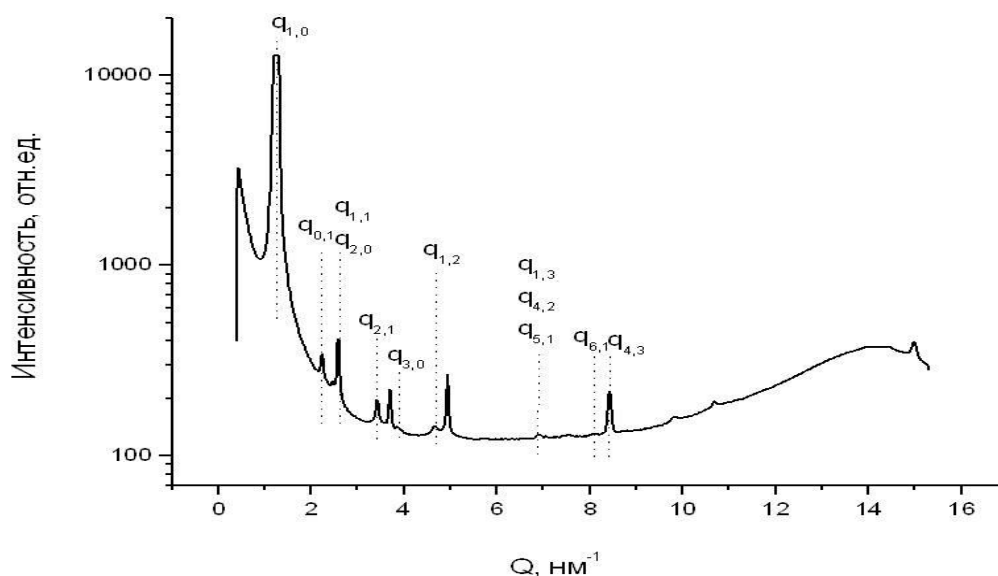


Рис. 5. Дифракционный спектр от частично гидратированной фосфолипидной фракции *Streptosporangium* sp. INA 34-06. Пики (q) от инвертированной гексагональной структуры (НП) жидкокристаллической фазы (i, j индексы Миллера (кристаллографические индексы)).

После 10 месяцев хранения при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  были проведены измерения спектров дифракции частично гидратированных фосфолипидных фракций. Данные измерения проводили с целью определения стабильности фазово-структурных состояний липидов. Результаты показали существенные различия в дифракционной картине фазовых состояний липидов. Структура образца *Str. hygrosopicus* не изменилась в процессе хранения, в то время как структура фосфолипидных фракций *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06 претерпела значительные изменения. Ранее отмечалось изменение параметров гексагональной структуры липидов *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 при измерениях, проведенных с интервалом в 2 недели. При последующем измерении этого же образца после 10 месяцев хранения произошло значительное изменение параметров гексагональной фазы ( $a = 7.32$  нм) и была выявлена ламеллярная фаза мембранной структуры с периодом повторяемости  $d = 5.56$  нм. Обнаружено также изменение параметров двухфазового состояния липидов фракции *Streptosporangium* sp. INA 34-06. В результате после хранения в структурной организации фосфолипидных фракций культур актиномицетов *Streptosporangium* sp. INA 34-06 и *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 появились сходные черты

Изучение гидратированных образцов фосфолипидных фракций в избытке воды показало, что после добавления воды не наблюдается существенных изменений в параметрах мембранных структур, построенных на основе липидов фракции *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>. Это объясняется тем, что плотная упаковка мультислойных слоев этих структур, препятствовала быстрому проникновению молекул воды в межмембранное пространство. В то же время,

гидратация образцов липидных фракций *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 и *Streptosporangium sp.* INA 34-06 привела к существенным изменениям их структуры. При гидратации образца *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 отмечено увеличение расстояния между бислоями мембранной структуры ( $d = 5.76$  нм), образованной липидами ламеллярной фазы, а также между цилиндрами гексагональной фазы ( $a = 7.71$  нм), то есть, образец находился в состоянии "набухания" [Рябова и др., 2010]. Дифракционный спектр гидратированного образца *Streptosporangium sp.* INA 34-06 характеризовался исчезновением ранее существовавших и появлением новых пиков. Такой вид спектра свидетельствовал о смешивании или образовании новой (новых) фаз липидов фракции. Исследования показали, что фосфолипидные фракции клеточных мембран актиномицетов имеют различную структурную организацию, которая определяется составом доминирующих фосфолипидов, температурными условиями и гидратацией. Фосфатидилглицерин – основной компонент фосфолипидной фракции *Str. hygroscopicus* RIA 1433, его молекулы образуют только ламеллярную фазу в диапазоне температур до  $+55^{\circ}\text{C}$  и степени обводненности в диапазоне 20-95% в/в [Morein et al., 1996]. Таким образом, мультиламеллярная структурная организация фосфолипидной фракции *Str. hygroscopicus* RIA 1433 в условиях недостатка воды, формировалась за счет данного фосфолипида. Образец по своей структурной организации был однороден и отличался стабильностью. Фазово-структурная организация фракций мембранных липидов исследованных *Streptosporangium sp.* INA 34-06 и *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 была не стабильна. Их фазовое состояние зависело от уровня гидратации, и изменялось в процессе хранения. Структурная нестабильность липидных фракций данных актиномицетов объясняется высоким содержанием в них фосфатидилэтаноламина. Минорные компоненты, такие как фосфатидилглицерин способствуют формированию бислоевых структур, а при понижении температуры препятствуют кристаллизации бислоя, что приводит к образованию стабильной гелевой фазы [Белоус и др., 1979].

**Хранение культур актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>,  
*Streptosporangium sp.* INA 34-06 и *Nonomuraea roseoviolacea subsp. carminata*  
INA 4281 методом низкотемпературного замораживания.**

При замораживании споровых суспензий исследуемых культур в более высоких концентрациях ( $10^6$  и  $10^7$ ) выживаемость в течение 3-х лет составила 100% у каждого штамма, так же как и в опыте, где концентрация споровых суспензий составляла  $10^5$  КОЕ/мл. Криопротектор так же не влиял на выживаемость актиномицетов.

Исследования антибиотической активности актиномицетов показали, что в течение 3-х лет полностью сохраняется антибиотическая активность в отношении тест-микроорганизмов у штамма *Str. hygroscopicus*, потеря антибиотической активности наблюдалась у культуры *N. roseoviolacea subsp. carminata* (9% колоний), самая большая потеря активности (68% колоний) была у *Streptosporangium sp.* INA 34-06. В таблице 1 показана антибиотическая

активность культур до замораживания и после 3-х лет хранения (для колоний, сохранивших антибиотическую активность).

Таблица 1. Антибиотическая активность актиномицетов *Str.hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06 в отношении тест-организмов.

Название тест-организма	Антибиотическая активность (зона подавления роста, мм)					
	<i>Str. hygroscopicus</i> RIA 1433 <sup>T</sup>		<i>N. roseoviolacea</i> subsp. <i>carminata</i> INA 4281		<i>Streptosporangium</i> sp. INA 34-06	
	до заморозки	после 3-х лет хранения	до заморозки	после 3-х лет хранения	до заморозки	после 3-х лет хранения
<i>S.aureus</i> ИНА 00985	25,1±0,43	25,2±0,25	15±0,39	14,8±0,37	10,2±0,46	10,4±0,31
<i>S.aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	24,7±0,48	24,5±0,31	15±0,39	15±0,48	5±0,39	5±0,39
<i>S.aureus</i> ИНА 00762	24,9±0,58	25±0,48	19,7±0,39	20,2±0,25	9,7±0,39	9,8±0,37
<i>M.luteus</i> ATCC 9341	25,2±0,25	24,8±0,25	20,2±0,37	20,2±0,37	10,4±0,3	10,4±0,3
<i>B. subtilis</i> ATCC 6533	15±0,28	15±0,39	10,4±0,31	10,2±0,46	5±0,48	5±0,39
<i>E. coli</i> ATCC 25922	14,9±0,33	15±0,39	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Sac.cerevisiae</i> ИНА 01042	20,2±0,25	20±0,39	-	-	-	

Следует отметить, что антибиотическая активность штамма *Streptosporangium* sp. INA 34-06 при хранении в обычных условиях – в пробирках на плотных питательных средах также была нестабильна. Для поддержания антибиотической активности штамма регулярно проводили отбор антибиотически активных колоний. Исходя из полученных данных, следует, что ответом на воздействие низких температур (-70<sup>0</sup>C) является потеря антибиотической активности колониями штамма *Streptosporangium* sp. INA 34-06.

Изучение жизнеспособности клеток при хранении в концентрациях - 10<sup>2</sup> КОЕ/мл показало, что даже при низких концентрациях спорных суспензий штамм *Str.hygroscopicus* не только не утратил жизнеспособности, но и полностью сохранил антибиотическую активность в отношении тест-микроорганизмов в течение 1.5 лет в отличие от культур родов *Nonomuraea* и *Streptosporangium*, которые полностью утратили жизнеспособность после восьми месяцев хранения (рис. 6).

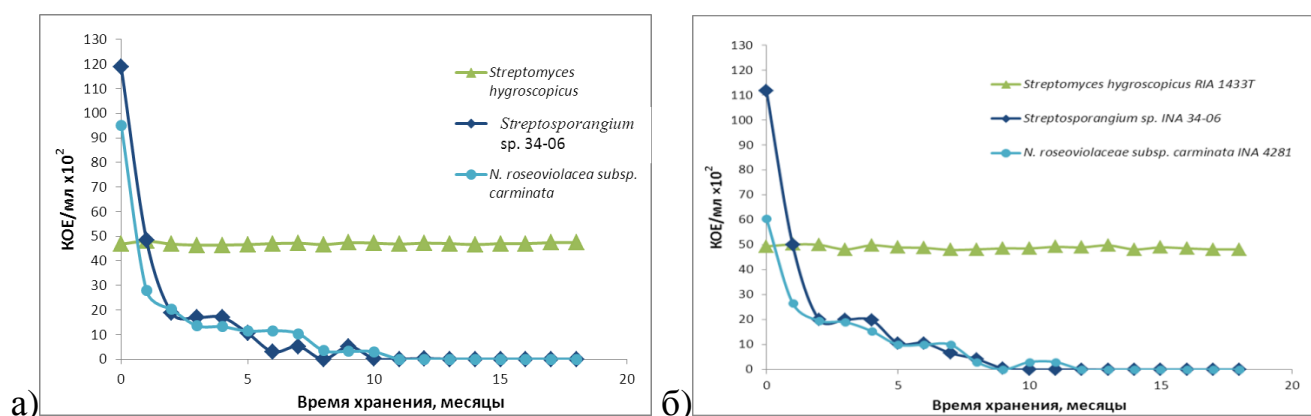


Рис.6. Выживаемость актиномицетов *Str. hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *N.roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06 при хранении при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  при низкой концентрации споровых суспензий; а) без использования криопротектора, б) с криопротектором.

В данных исследованиях было показано, что коллекционные культуры актиномицетов хорошо переносят низкотемпературное замораживание при концентрации спор  $10^5 - 10^7$  КОЕ/мл, сохраняя высокий титр жизнеспособных клеток. При хранении в низких концентрациях  $10^2$  КОЕ/мл высокой жизнеспособностью обладали только споры *Str. hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>. Использование криопротектора не повлияло на выживаемость клеток при хранении их в высоких концентрациях. Не было выявлено положительного воздействия криопротектора на жизнеспособность клеток актиномицетов при хранении их в низких концентрациях.

### Выделение редких родов актиномицетов из почвы с добавлением сока алоэ

Актиномицеты были выделены из образцов дерново-подзолистой почвы и чернозема. Полученные результаты представлены в таблицах 2-5.

Таблица 2. Количество актиномицетов, выделенных с добавлением сока алоэ на овсяной среде из образца дерново-подзолистой почвы.

Концентрация сока алоэ (%)	Время настаивания суспензии	Количество актиномицетов КОЕ/г почвы $\times 10^3$		
		Род <i>Streptomyces</i>	Редкие роды	Общее количество
Контроль (без сока алоэ)	10 минут	$166 \pm 19,2$	$34 \pm 6,8$	$200 \pm 29,3$
	1 час	$140 \pm 19,2$	$36 \pm 12,4$	$176 \pm 19,2$
10% алоэ в суспензии	10 минут	$216 \pm 31,4$	$40 \pm 12,4$	$256 \pm 31,3$
	1 час	$176 \pm 31,4$	$56 \pm 15,7$	$232 \pm 45,7$
50% алоэ в суспензии	10 минут	$240 \pm 35,0$	$48 \pm 9,6$	$288 \pm 45,7$
	1 час	$200 \pm 42,9$	$48 \pm 9,6$	$248 \pm 29,3$



Таблица 3. Количество актиномицетов, выделенных с добавлением сока алоэ на среде №2 Гаузе из образца дерново-подзолистой почвы.

Концентрация сока алоэ (%)	Время настаивания суспензии	Количество актиномицетов КОЕ/г почвы×10 <sup>3</sup>		
		Род <i>Streptomyces</i>	Редкие роды	Общее количество
Контроль (без сока алоэ)	10 минут	202 ± 29,3	22 ± 3,3	224 ± 39,9
	1 час	206 ± 19,3	18 ± 1,84	224 ± 20,1
10% алоэ в суспензии	10 минут	248 ± 38,4	48 ± 15,7	296 ± 39,9
	1 час	240 ± 35,1	56 ± 19,2	296 ± 31,3
50% алоэ в суспензии	10 минут	248 ± 29,3	32 ± 7,8	280 ± 42,9
	1 час	216 ± 19,2	32 ± 7,8	248 ± 38,4

Таблица 4. Количество актиномицетов, выделенных с добавлением сока алоэ на овсяной среде из чернозема Оренбургской области.

Концентрация сока алоэ (%)	Время настаивания суспензии	Количество актиномицетов КОЕ/г почвы×10 <sup>3</sup>		
		Род <i>Streptomyces</i>	Редкие роды	Общее количество
Контроль (без сока алоэ)	10 минут	640 ± 55,4	104 ± 19,2	744 ± 39,9
	1 час	608 ± 67,4	120 ± 24,8	728 ± 38,4
10% алоэ в суспензии	10 минут	728 ± 29,3	176 ± 19,2	904 ± 31,4
	1 час	712 ± 29,3	160 ± 27,7	872 ± 29,3
50% алоэ в суспензии	10 минут	680 ± 35,1	160 ± 24,8	840 ± 24,8
	1 час	712 ± 38,4	168 ± 29,3	880 ± 35,1

Таблица 5. Количество актиномицетов, выделенных с добавлением сока алоэ на среде 2 Гаузе из чернозема Оренбургской области.

Концентрация сока алоэ (%)	Время настаивания суспензии	Количество актиномицетов КОЕ/г почвы×10 <sup>3</sup>		
		Род <i>Streptomyces</i>	Редкие роды	Общее количество
Контроль (без сока алоэ)	10 минут	608 ± 29,3	200 ± 42,9	808 ± 67,4
	1 час	616 ± 40,0	168 ± 29,3	784 ± 40,0
10% алоэ в суспензии	10 минут	704 ± 53,2	224 ± 19,2	928 ± 57,6
	1 час	720 ± 36,4	208 ± 35,1	928 ± 57,6
50% алоэ в суспензии	10 минут	696 ± 53,2	288 ± 29,3	984 ± 63,7
	1 час	672 ± 67,4	208 ± 45,7	880 ± 55,4

Первое, что было нами отмечено в процессе эксперимента, что при добавлении сока алоэ в почвенные суспензии, на чашках Петри с питательными средами практически отсутствовал рост немителиальных бактерий и грибных колоний, что значительно облегчило выделение актиномицетов. Отсутствие роста одноклеточных бактерий и грибов, вероятно, связано с бактерицидным и фунгицидным действием сока алоэ.

Полученные данные показали, что из образца №2 (чернозема Оренбургской области) выделилось в 3.5 раза больше колоний актиномицетов, чем из дерново-подзолистой почвы (образца №1). Также было отмечено, что процент колоний

редких родов актиномицетов, выросших из образца почвы №2, был выше, чем процент колоний, выросших из образца почвы №1.

Увеличение общего количества выросших колоний в экспериментах с добавлением сока алоэ происходило как за счет увеличения численности актиномицетов рода *Streptomyces*, так и за счет увеличения численности представителей редких родов. Это можно объяснить тем, что на чашках с выросшими колониями актиномицетов рост быстрорастущих грибных колоний и колоний немикелиальных бактерий был минимальным или совсем отсутствовал, что способствовало обильному росту медленнорастущих колоний актиномицетов. Как видно из таблиц 2-5 на чашках со средой Гаузе №2 выросло больше актиномицетных колоний, чем на овсяной среде. Данная закономерность установлена для обоих образцов почвы. Была отмечена закономерность в соотношении долей выделенных колоний редких родов актиномицетов и актиномицетов рода *Streptomyces*. Для образца почвы №2 (чернозем) наблюдалось небольшое увеличение процентного содержания актиномицетов редких родов до 5% при добавлении сока алоэ. Однако для образца дерново-подзолистой почвы (образец №1) доля выделенных актиномицетов в опытных образцах увеличивалась до 11% по сравнению с контролем (при выделении на среде №2 Гаузе с добавлением 10% сока алоэ, выдерживании суспензии 1 час).

Таким образом, в большинстве вариантов при добавлении сока алоэ наблюдалось пропорциональное увеличение количества выделенных колоний актиномицетов редких родов и колоний актиномицетов, распространенного рода *Streptomyces*, т.е. были созданы условия для активного роста представителей обеих групп актиномицетов, но в некоторых вариантах удалось увеличить долю выделенных актиномицетов редких родов.

Всего в ходе работы в чистую культуру было выделено 527 штаммов актиномицетов.

### **Изучение актиномицетов, выделенных из почвы с добавлением сока алоэ**

Предварительная идентификация выделенных 527 культур актиномицетов на основании морфологических и хемотаксономических признаков – наличия изомеров ДАПК и дифференцирующих сахаров показала, что 426 штаммов актиномицетов относятся к роду *Streptomyces*, 44 штамма к роду *Micromonospora*, 57 штаммов к другим редким родам.

Выделенные из почвы культуры были проверены на антибиотическую активность в отношении тест-микроорганизмов. Результаты показали, что 369 штаммов активны в отношении грамположительных тест-организмов, 79 штаммов актиномицетов активны в отношении грамотрицательных тест-организмов, 52 штамма актиномицетов проявляли активность в отношении *Sac. cerevisiae* ИНА 01042.

Дальнейшее изучение выделенных культур редких родов с использованием сиквенс-анализа показало, что данные культуры относятся к следующим родам: *Micromonospora* 44 культуры, *Nonomuraea* 5 культур, *Streptosporangium* 9 культур, *Nocardia* 13 культур, *Actinomadura* 8 культур, *Actinocorallia* 1 культура, *Pseudonocardia* 5 культур, *Amycolatopsis* 4 культуры, *Saccharomonospora* 1 культура, *Saccharopolyspora* 1 культура, *Promicromonospora* 3 культуры, *Kribbella* 1 культура.

Для сравнения влияния низкотемпературного хранения на культуры актиномицетов редких родов и широко распространенных культур рода *Streptomyces*, нами было проведено изучение 9 культур стрептомицетов, выделенных в опытах с добавлением сока алоэ. Стрептомицеты были отнесены к следующим видам: *Str. libani* (INA 01191), *Str. chrestomyceticus* (INA 01192), *Str. aurantiacus* (INA 01193), *Str. nigrescens* (INA 01194), *Str. canus* (INA 01195), *Str. glycovorans* (INA 01196), *Str. ederensis* (INA 01197), *Str. albogriseolus* (INA 01198), *Str. hygrosopicus* (INA 01199).

#### **Изучение влияния сока алоэ на антибиотическую активность выделенных актиномицетов редких родов**

Следующим этапом изучения действия сока алоэ было исследование его действия в различных концентрациях на антибиотическую активность актиномицетов. Для сравнения действия нескольких факторов на антибиотическую активность выделенных актиномицетов применяли синтетический адреналин, сок алоэ древовидного, для совместного культивирования использовались тест-микроорганизмы *S. aureus* ИНА 00762 (инактивированные автоклавированием) и *M. luteus* ATCC 9341 (живые и инактивированные).

Для экспериментов были отобраны следующие культуры актиномицетов: *Nocardia* sp. OS/21, *Nonomuraea* sp. OS/17, *Nonomuraea* sp. OS/19, *Actinomadura* sp. OS/37, *Actinomadura* sp. OS/40, *Kribbella* sp. OS/32. Данные культуры были выделены с использованием сока алоэ и обладали антибиотической активностью в отношении тест-микроорганизмов *S. aureus* ИНА 00762 и/или *M. luteus* ATCC 9341. Для сравнения действия веществ, увеличивающих синтез антибиотиков, были использованы также коллекционные культуры актиномицетов: *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *N. roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06.

Результаты показали, что адреналин, инактивированные клетки *S. aureus* ИНА 00762 и *M. luteus* ATCC 9341, сок алоэ в концентрации 5% не влияют на рост актиномицетов и антибиотикообразование. Культивирование *M. luteus* совместно с актиномицетами *Nocardia* sp. OS/21, *Nonomuraea* sp. OS/17, *Nonomuraea* sp. OS/19, *Actinomadura* sp. OS/37, *Actinomadura* sp. OS/40, *Kribbella*

sp. OS/32 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06 выявило увеличение зоны подавления роста тест-микроорганизмов, более раннее начало синтеза антибиотика или увеличение времени синтеза антибиотика. Сок алоэ в концентрации 10% оказывает положительное влияние на синтез антибиотиков у 6 культур актиномицетов *Nocardia* sp. OS/21, *Nonomuraea* sp. OS/17, *Actinomadura* sp. OS/37, *Actinomadura* sp. OS/40, *Kribbella* sp. OS/32 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06.

### **Хранение выделенных культур актиномицетов редких родов методом низкотемпературного замораживания**

Для изучения выживаемости актиномицетов при длительном хранении при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  нами были использованы следующие культуры: *Streptosporangium* sp. OS/7 – OS/15, *Nonomuraea* sp. OS/16 – OS/20, *Nocardia* OS/21- OS/25, OS/28-OS/30 и OS/32, *Actinomadura* OS/34 – OS/41, *Actinocorallia* sp. OS/42, *Pseudonocardia* sp. OS/43 – OS/47, *Amycolatopsis* sp. OS/48-OS/51, *Saccharopolyspora* sp. OS/56 и культура *Saccharomonospora* sp. OS/57. Данные культуры хорошо росли на овсяной агаризованной среде и образовывали воздушный мицелий, формирующий споры.

Для сравнения влияния низкотемпературного хранения на культуры актиномицетов редких родов и широко распространенных культур рода *Streptomyces*, культуры актиномицетов редких родов были одновременно заложены на хранение с выделенными культурами стрептомицетов: *Str. libani* (INA 01191), *Str. chrestomyceticus* (INA 01192), *Str. aurantiacus* (INA 01193), *Str. nigrescens* (INA 01194), *Str. canus* (INA 01195), *Str. glycovorans* (INA 01196), *Str. ederensis* (INA 01197), *Str. albogriseolus* (INA 01198), *Str. hygrosopicus* (INA 01199).

Актиномицеты были заложены на хранение в виде споровых суспензий. Хранение осуществлялось в течение 3-х лет. В результате проведенных исследований установлено, что споры стрептомицетов, суспендированные в дистиллированной воде в концентрации  $10^7$  –  $10^8$  КОЕ/мл, хорошо переносят процесс низкотемпературного замораживания с последующим оттаиванием при комнатной температуре. Выживаемость культур стрептомицетов составила 93-97%. Выживаемость культур стрептомицетов в вариантах без использования криопротектора, так и с применением 10% раствора глицерина, на протяжении всего периода хранения оставалась на одном уровне.

Жизнеспособность культур актиномицетов редких родов также была на высоком уровне. На рисунке 7 представлены усредненные данные (по родам актиномицетов) по количеству выживших КОЕ после 3-х лет хранения в процентах относительно контроля (количество КОЕ до замораживания). Полученные результаты показали, что выживаемость исследуемых актиномицетов

в течение всего периода хранения была на высоком уровне, т.е. более 90% клеток сохраняло жизнеспособность как с использованием криопротектора (10% раствора глицерина), так и без него.

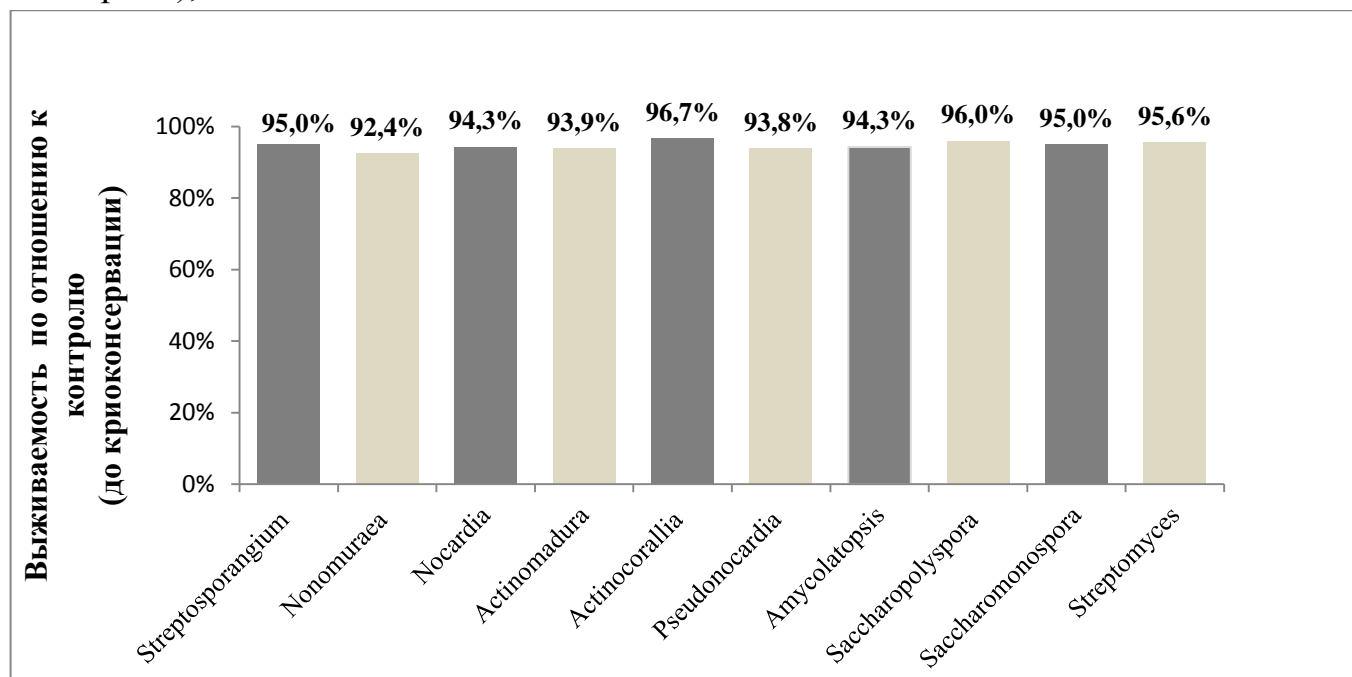


Рис. 7. Средняя выживаемость культур актиномицетов после 3-х лет хранения при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  без использования криопротектора.

Изучение антибиотической активности актиномицетов в течение всего периода хранения показало, что споры актиномицетов обладают не только высокой устойчивостью к замораживанию, но и сохраняют высокий уровень антибиотической активности (90-97%) по отношению к каждому тест-микроорганизму, к которым была установлена антибиотическая активность до замораживания. Следует отметить, что при регулярных пересевах в обычных условиях также наблюдалась небольшая дифференциация колоний на более и менее активные, таким образом, появление менее активных колоний не является следствием замораживания и/или хранения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделение актиномицетов из природных источников является первым этапом поиска новых антибиотиков. В почвах обитает большое разнообразие микроорганизмов, между которыми существуют тесные взаимосвязи и борьба за источники питания. При высевах на чашках Петри наблюдается большое количество быстрорастущих колоний бактерий и грибов. Актиномицеты, особенно культуры, относящиеся к редким родам, растут медленнее и их трудно выделить в чистую культуру из-за обилия бактериальных колоний. Важно разрабатывать новые методы, которые позволяют выделить не только быстрорастущие колонии стрептомицетов, но и медленно растущие колонии актиномицетов редких родов. Для этого был разработан новый метод выделения

актиномицетов из почвы с применением сока алоэ, с помощью которого удалось выделить большое количество актиномицетов, в том числе актиномицетов редких родов. Выделенные актиномицеты редких родов проявляли антибиотическую активность в отношении тест-организмов и, соответственно, могут быть продуцентами новых биологически активных веществ.

При изучении влияния сока алоэ на актиномицеты было показано его стимулирующее действие на синтез антибиотиков актиномицетами. Возможно, в дальнейшем сок алоэ или его отдельные компоненты можно будет применять для индукции биосинтеза антибиотиков.

Изучение состава и фазово-структурной организации липидов выявило различия в формировании структур клеточных мембран, что позволило объяснить различия в выживаемости актиномицетов разных родов при низких концентрациях клеток. В результате исследований в области долгосрочного хранения при  $-70^{\circ}\text{C}$  разных родов актиномицетов было установлено, что использование криопротектора не влияет на выживаемость клеток и их антибиотическую активность, что позволяет хранить культуры актиномицетов без использования криопротекторов.

### ВЫВОДЫ

1. Изучен состав и фазово-структурная организация фосфолипидов мембран актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06. Установлено, что различия в структурной организации фосфолипидов зависят от их качественного состава. Показано, что ламеллярные структуры более устойчивы к воздействию стрессовых факторов.
2. Изучено влияние низких температур на выживаемость и сохранение антибиотической активности актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06 при длительном хранении при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Показано, что данные актиномицеты сохраняют высокую жизнеспособность и антибиотическую активность в течение 3-х лет при концентрации клеток  $10^5 - 10^7$ .
3. Показано, что выживаемость актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata*, *Streptosporangium* sp. INA 34-06 при длительном хранении в условиях низких температур не зависит от использования криопротектора (10% раствора глицерина), а зависит от концентрации клеток в суспензии.
4. Разработан метод выделения актиномицетов редких родов из почвы с добавлением сока алоэ. В результате было выделено большое разнообразие культур редких родов актиномицетов: *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinocorallia*, *Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Promicromonospora*,

*Kribbella*. Установлено, что выделенные культуры обладают антибиотической активностью в отношении тест-микроорганизмов, в том числе в отношении *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA).

5. Изучена выживаемость выделенных культур актиномицетов редких родов в условиях низких температур ( $-70^{\circ}\text{C}$ ). Установлено, что культуры, способные формировать споры, сохраняют высокую жизнеспособность и антибиотическую активность в течение длительного времени без применения криопротектора. Основным показателем успешной закладки на хранение является высокая концентрация ( $10^7$ - $10^8$ ) клеток.

**Список опубликованных работ  
в изданиях, рекомендованных ВАК**

1. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Ермакова Е.В., Киселев М.А., Терехова Л.П., Синёва О.Н., Галатенко О.А., Забелин А.В., Гальченко В.Ф. Изучение фазово-структурного состояния фосфолипидных фракций актинобактерий в связи с условиями их хранения // Микробиология. – 2013. – Т. 82. - №3. – С. 335-343.
2. Синёва О.Н., Куликова Н.Г., Филиппова С.Н., Терехова Л.П. Хранение культур актинобактерий – представителей родов *Streptomyces* и *Nonomuraea* методом низкотемпературной консервации // Антибиотики и химиотерапия.- 2014. – Т. – 59. - № 11-12. – С. 11-15.
3. Синёва О.Н., Терехова Л.П. Направленное выделение актиномицетов редких родов из почвы // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – Т. 60. - № 7-8. – С. 27-33.
4. Синёва О.Н., Иванкова Т.Д., Терехова Л.П. Низкотемпературное хранение актиномицетов – представителей рода *Streptomyces* // Антибиотики и химиотерапия. – 2019. – Т. 64. - № 3-4. – С. 3-7.

**Статьи в сборниках научных трудов и тезисы докладов на научных конференциях**

1. Синёва О.Н., Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Ермакова Е.В., Киселев М.А., Галатенко О.А., Терехова Л.П., Забелин А.В., Гальченко В.Ф., Исследование фосфолипидных фракций клеточных мембран актинобактерий методом дифракции рентгеновских лучей // Материалы Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии. Москва. – 2012. – С. 348-349.
2. Синёва О.Н., Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Ермакова Е.В., Киселев М.А., Галатенко О.А., Терехова Л.П., Забелин А.В., Гальченко В.Ф. Изучение влияния низких температур на выживаемость актинобактерий // Материалы Международной конференции «Биология – наука XXI века» Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова. Москва. – 2012. С. 844-845.

3. Синёва О.Н., Иванкова Т.Д., Терехова Л.П. Использование сока алоэ для выделения актиномицетов // Материалы III Международной научно-практической конференции «Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития». Краснодар. – 2013. – С. 105-107.
4. Синёва О.Н., Галатенко О.А., Филиппова С.Н., Терехова Л.П. Изучение выживаемости актиномицетов – продуцентов антибиотиков при хранении в условиях низких температур // VII Московский Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Сборник тезисов докладов. Москва. – 2013. – С. 208-209.
5. Синёва О.Н., Галатенко О.А., Терехова Л.П. Влияние сока алоэ на выделение актиномицетов из почвы // XIII съезд товарищества микробиологов Украины им. С.Н. Виноградского. Сборник тезисов докладов. Ялта. – 2013. – С. 202.
6. Синёва О.Н., Куракина Е.А., Филиппова С.Н., Терехова Л.П. Влияние низкотемпературного хранения на жизнеспособность актиномицетов – продуцентов антибиотиков // Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни. Москва. – 2014. – С. 144-145.
7. Синёва О.Н. Влияние сока алоэ древовидного на антибиотическую активность актинобактерий, выделенных из почвы. Материалы XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» - 2015». Секция «Биология». Москва. – 2015. – С. 235.
8. Синёва О.Н., Терехова Л.П. Хранение актиномицетов рода *Streptomyces* методом низкотемпературного замораживания // Материалы IV Международной конференции «Микробное разнообразие. Ресурсный потенциал. Биотехнология и современность». ICOMID 2016. Москва. – 2016. – С. 72.
9. Синёва О.Н. Терехова Л.П. Низкотемпературное хранение актинобактерий рода *Streptomyces* // Материалы IX Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва. – 2017. – Том 1. – С. 200-202. с.
10. Синёва О.Н., Терехова Л.П. Хранение актиномицетов редких родов методом низкотемпературного замораживания // Материалы 1-го Российского микробиологического конгресса. Пущино. – 2017. – С. 81.
11. Синёва О.Н. Выделение актиномицетов – потенциальных продуцентов антибиотиков с применением сока *Aloe Arborescens* // Тезисы докладов научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний». Москва. – 2018. – С.50.