

Махмудова Г.С., Кебекбаева К.М., Джобулаева А.К.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ АКТИНОМИЦЕТОВ-ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ

Институт микробиологии и вирусологии, г. Алматы

Изучение изменчивости микроорганизмов имеет значение для повышения продуктивности штаммов, используемых в пищевой и медицинской промышленности, ветеринарии, животноводстве и сельском хозяйстве. Процесс хранения предусматривает непостоянство условий внешней среды, что ведет к изменению характерных признаков, состава популяции, соотношения высокоактивных и низкоактивных форм.

Актиномицеты обладают повышенным разнообразием морфологии: каждая популяция содержит клетки, отличающиеся морфологическими, биохимическими свойствами. Такая изменчивость позволяет быстро приспосабливаться к изменению условий среды и сроков хранения.

Наследственная изменчивость актиномицетов подчиняется закону гомологических рядов [1, 2]. В популяциях любых видов, наряду с основной формой, существуют варианты: олигоспоровые, аспорогенные, карликовые, нокардиоподобные, окрашенные. Ряды изменчивости возрастают за счет появления дополнительного отличительного свойства-биосинтеза антибиотиков. Степень проявления процесса изменчивости зависит от генетической природы организма и условий внешней среды. При лиофилизации и криоконсервации возникновение спонтанных мутаций не исключено. По данным Р.С. Орловой [3], после лиофилизации в популяции продуцента антибиотика розеофунгина преобладали высокоактивные варианты. Иногда после лиофилизации соотношение вариантов может оставаться почти неизменным, что, возможно, связано с защитным действием высокой концентрации клеток в лиофилизированной суспензии спор [4].

В проведенных исследованиях изучали влияние условий хранения с помощью лиофилизации на жизнеспособность членов популяции и проявление биологической активности.

Материалы и методы

Для исследования взяты два актиномицета: *Streptomyces roseoflavus* Arai шт. 23/791-продуцент антибиотика розеофунгина [5], и *S. antibioticus* шт. 25/779 - продуцент кормового препарата, содержащего антибиотик и витамины группы В [6].

Для хранения актиномицетов использовали общепринятые среды с агаром: Гаузе - 1, Гаузе - 2, Чапека с глюкозой, Чапека с сахарозой, кукурузная - 6, рыбная - 51.

Культуры хранились в лиофилизированном состоянии общепринятым методом (высушивание замороженных клеток по вакуумом). Реактивацию проводили в оптимальных средах, при наиболее подходящей для каждой культуры температуре.

Для подсчета выживаемости актиномицетов использовали общепринятый метод. Культурально- морфологические признаки определяли по росту и развитию на разных питательных средах. Учитывали форму, величину и консистенцию колоний, образование растворимого пигмента (окраска питательной среды). Цвета определяли по шкале А.С. Бондарцева [7], обозначения в тексте приводятся в скобках. Размеры и формы микробных клеток и спор, поверхность оболочки, строение органов плодоношения изучали с помощью электронного и светового микроскопов.

Антибиотическую активность продуцентов изучали методом серийных разведений и диффузии в агар, тест-организмы -согласно регламентам, разработанным авторами по каждому новому антибиотику. Концентрацию витаминов группы В определяли методом диффузии в агар [8]. Состав популяции изучали по методу, рекомендованному В.Д. Кузнецовым [1].

Результаты и обсуждение

На питательных средах исходная культура 23/791 образовывала 4 типа колоний, различающихся по морфологии, окраске воздушного и субстратного мицелиев и антибиотической активности:

I – ОСНОВНОЙ – колонии с неровными без наплыва краями, воздушный мицелий бледно-розоватый, бархатистый (н 5). Субстратный – желтовато-коричневый (д 4). Среда не окрашена.

II – ОЛИГОСПОРОВЫЙ – колонии с неровными без наплыва краями, воздушный мицелий слегка белорозоватый в виде налета (н 5). Субстратный – табачно-бурый (д 7). Пигмент слегка диффундирует в среду.

III – МЕЛКИЙ – колонии с точечным центром и воздушный мицелий бледно-розоватый (н 5). Субстратный мицелий – желтовато-буроватый (д 4). Пигмент не диффундирует в среду.

IV – СЕКТОРНЫЙ – колонии с мучнисто-розовым центром и воздушный мицелий – бледно-розоватый (н 5). Субстратный мицелий – желтовато-буроватый (д 4). Пигмент не диффундирует в среду.

В таблице 1 представлены данные антибиотической активности колоний разного типа.

Как видно из таблицы 1, в составе популяции исходной культуры встречались колонии I и IV типа с разной антибиотической активностью.

Таблица 1 - Состав популяции исходной культуры шт. 23/791

Средства для посева	Тип колоний	Количество колоний, %	Антибиотическая активность, ед/мл
Чапека с глюкозой	I	100	1024
Гаузе - 1	I	50,8	1024
	II	36,0	729
	III	8,7	2187
	IV	4,5	1024
Кукурузная - 6 Рыбная - 51	I	90,0	2187
	II	7,0	729
	III	3,0	729-2187
Рыбная - 51	I	95,0	243-2187
	II	2,5	729
	III	2,5	729

В составе популяции лиофилизированной культуры колоний III и IV типа не обнаружено, за исключением рыбной -51 (табл. 2). Как видно из таблицы, в популяции преобладал основной вариант с низкой антибиотической активностью (9-1024 ед/мл), а на кукурузной обнаружен новый тип колоний – V, активность которого была выше исходной – 4374-6561 ед/мл.

Таблица 2 - Состав популяции лиофилизированной исходной культуры шт. 23/791 на разных средах

Средства для посева	Тип колоний	Количество колоний, %	Антибиотическая активность, ед/мл	Примечание
Чапека с глюкозой	I	99,7	243-729	Типичный
	II	0,3	729	
Гаузе - 1	I	98,6	27	
	II	1,4	2187	
Кукурузная - 6	I	50,0	9	Окраска бледнее, чем у исходной культуры Гладкие плоские колонии с ободком, вся колония бар-хатистая, воздушный мицелий – телесный, субстратный-темно-бурый
	V	50,0	4374-6561	
Рыбная - 51	I	62,8	1024	Воздушный мицелий серовато-желтый. Колонии радиально-складчатые
	II	31,4	243	
	III	5,8	27	

Примечание: описание I - III типов колоний даны выше.

Таблица 3 - Культурально–морфологическая изменчивость и процент встречаемости штамма 25/779 на соевой среде

Тип колоний	Морфологические варианты (колонии)	Встречаемость в расसेве		Активность	
		Кол-во колоний, млн.	%	Антибиотическая, ед/мл	Витаминообр., мкг/мл
I	Основной тип с серым бархатистым воздушным мицелием (в 4), колонии с ровными краями, складчатые, окрашены в грязно-рыжевато-серый цвет (н 1), среда не окрашена.	50	54,4	2,32	0,7-1,5
II	Колонии с ровным краем, радиально-складчатые, воздушный мицелий черновато-бурый (в 4), субстратный мицелий рыжеватый (ж 2).	30	32,6	16,0	1,0
III	Плоские колонии с желтовато-серым воздушным мицелием 9 в 3), субстратный мицелий буровато-желтый (б 5).	12	13,0	2,0	0,3

Следующие исследования проведены с продуцентом кормового препарата *S. antibioticus* шт. 25/779 и его вариантом, хранившихся в течение 2,5 лет на соевой среде и в виде лиофильно высушенных спор.

Наименьшая морфологическая изменчивость исходной культуры этого штамма наблюдалась на соевой среде с образованием 4 морфологических вариантов, у варианта 24 антибиотическая активность культуральной жидкости составляла 32 ед/мл и витаминообразование - 1.1 мкг/мл.

В серии опытов изучали естественную изменчивость данного варианта на 4-х питательных средах. Наши исследования подтвердили, что на соевой среде вариант 24 образует 3 типа колоний (таблица 3).

Установлено, что вариант 24 на соевой среде после лиофилизации образует 5 различных типов колоний. У всех вариантов способность синтезировать витамин резко снизилась, антибиотическая активность осталась в двух случаях в пределах исходной, в одном – повысилась до 128 ед/мл (таблица 4). У двух вариантов III и IV обнаружена практически нулевая активность.

Таблица 4 - Морфологическая изменчивость популяции лиофилизированной культуры штамма 25/779 на соевой среде (периодичность – 3 года)

Тип колоний	Морфологические варианты штамма (колонии)	Встречаемость в рассевае		Активность	
		Кол-во колоний, млн.	%	Антибиотическая, ед/мл	Витаминообр., мкг/мл
I		110	51,6	32	0,3
II		62	29,1	32	0,4
III		27	12,6	0	0,1
IV	Карликовые, плоские, серые с более светлым ободком вокруг колонии, воздушный мицелий буровато-серый (б4-в4). Субстратный мицелий бурый (~к 7), пигмент рыжеватый, диффундирует в среду.	12	5,6	128	0,4
V	Концентрические, плоские в центре, воздушный мицелий серый (в 4), ободки светло-серые, край темно-серый, радиально-складчатый. Субстратный мицелий темно-серый (а2).	2	0,9	0	0,1

Примечание: описания I,II, III типов колоний этого штамма даны в таблице 3.

Наибольшая гетерогенность культуры проявилась на среде Гаузе 1, типы колоний сгруппированы на 12 морфологических вариантов (таблица 5).

Варианты различаются по культуральным свойствам, по антибиотико- и витаминообразованию. Почти все варианты характеризовались хорошей биосинтетической деятельностью, варианты V, VI и IX превосходили исходной штамм по синтезу витамина и антибиотика в 1,5 - 2 раза.

Основной тип колоний с исходной активностью составлял 48,2%, высокоактивные типы (V, VI и IX) встречались в 19,2, 6,4 и 5,1% случаев соответственно. Вариант, синтезирующий витамины в незначительном количестве (0,23 мкг/мл) составлял 14,1% популяции и не продуцировал антибиотик.

Таблица 5 - Морфологическая изменчивость популяции лиофилизированной культуры штамма 25/779 на среде Гаузе 1 (периодичность – 3 года)

Тип колоний	Морфологические варианты (колонии)	Встречаемость в расसेве		Активность	
		Кол-во колоний, млн.	%	Антибиотическая, ед/мл	Витаминообр., мкг/мл
I		38	48,7	2-32	0,3-1
II		11	14,1	0	0,2
III		4	5,1	2-16	0,8-1,5
IV		4	5,1	2-64	0,8-1,5
V		15	19,1	2-64	0,8-2
VI	Как у II типа, но воздушный мицелий черный (a1) с небольшим количеством серого воздушного мицелия.	5	6,4	32-64	0,8-2
VII	Воздушный мицелий оранжево-розовый(г4), субстратный ми-целий желто-оранжевый (д2), пигмент оранжевый, диффун-дирует в среду.	2	1,2	32	1,3
VIII	Как I тип, но субстратный мицелий черный. Воздушный мицелий светло-серый с оранжевым оттенком (a1), желтовато-серый (в3).	1	1,2	32	0,7-1,2
IX	Колония в виде розеточек с углубленным центром. Воздушный мицелий оран-жевый (o3), субстратный ми-целий серый (в4).	4	5,1	32-128	0,8-2,0
X	Как IX, но центр бугристый	5	6,4	8-64	0,5-1,0
XI	Как IX, но центр конусом оранжевого цвета, радиально-складчатый, но субстратный мицелий бурый (~к 7), пигмент оранжевый, диффундирующий в среду.	5	6,4	8-64	0,3-1,0
XII	Колонии концентрические, воздушный мицелий светло-и темно-серого цвета (a2).	5	6,4	64-128	0,5-1,0

Примечание: описание I –V типов колоний дано в таблицах 3 и 4.

Таким образом, установлено, что в процессе хранения у изученных продуцентов изменялся состав популяции, выявляются различные по жизнеспособности, культурально-морфологическим признакам и биосинтетической активности типы колоний. Морфологическая вариабельность данных штаммов находится в прямой зависимости от состава питательных сред. Для длительного поддержания штамма 23/791 рекомендуется среда Чапека с глюкозой, для получения активных форм – кукурузная 6. Штамм 25/779 хранится на соевой среде, а селекция активных вариантов проводится на среде Гаузе 1.

Литература

1. Кузнецова В.Д. Гомологические ряды наследственной изменчивости//Антибиотики. - 1993. - №7. - С. 579.
2. Кузнецова В.Д., Сабиров с., Филиппова С.Н. Изучение популяционного состава *Actinomyces tumescens*, *Actinomyces albus* var. *fungatus* // Микробиология. - 1990. - Т. 67. - 6. - С. 1073.
3. Орлова Р.С. Влияние некоторых методов хранения на актиномицеты-продуценты новых антибиотиков //Тр. Ин-та микробиол. и вирусол. АН КазССР. - Алма-Ата, 1994.
4. Кузнецова В.Д., Бушуева Д.Л. Влияние лиофилизации на выживаемость спор актиномицетов – продуцентов стрептомицина и микомицина //Антибиотики. - 1993. - №10. - С. 89.
5. Кулдыбаев М.М. Новый актиномицет-продуцент антибиотика для растениеводства// Вестник АН КазССР. 1988.№3.С.63-69.
6. Сартабаева У.А., Фролова Л.Ф., Балицкая А.К. и др. Витамины группы В, продуцируемые актиномицетами// Тр. Ин-та микробиол.и вирусол. АН КазССР. - Алма-Ата, 1981. - Т. 17. - С. 10-17.
7. Бондарцев А.С. Шкала цветов. - М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1954. – 27 с.
8. Чайковская С.М., Дружинина Е.Н., Упрощенный чашечный метод определения концентрации витамина В₁₂// Микробиология - 1987. - Т. 26, вып. 5. - С. 609-613.

Түйін

Алынған нәтижелердің қорытындысына қарағанда, лиофилизация әдісімен сақатынған розеофунгин тектес антибиотикті бөліп шығарып *Streptomyces roseoflavus* Arai шт. 23/791 және азықтық препаратты бөліп шығаратын *S. antibioticus* шт. 25/779 олардың популяция құрамының өзгеретіндігі анықталған. Биосинтетикалық белсенділігі және дақылды-морфологиялық белгілерімен және тіршілікке қабілеттілігі бойынша ерекшеленетін колониялардың типтері анықталынды. Штаммдардың морфологиясының қоректік ортаның құрамына тікелей байланысты екендігі айтылған.

Summary

It was established that keeping roseofungin like type antibiotic producer *Streptomyces roseoflavus* Arai 23/791 and producer of a fooder preparation *S. antibioticus* 25/779 in liophylized state changes population structure. Types of colonies, varying on viability, cultural-morphological attributes and biosynthetic activity are revealed. Morphological variability of depends on composition of nutritional media.

УДК 547.814 542.48 615.46

Поляков В.В.¹, Соболевский П.А.¹, Адекенов С.М.²

ФИТОПРЕПАРАТ «КЭМПОЛ» ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННО-РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

¹ *Северо-Казахстанский государственный университет, г. Петропавловск, Казахстан, vpolyakov44@rambler.ru*

² *АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»*

Ежегодно 24 марта во всем мире проводится День борьбы с туберкулезом. Именно в этот день в 1882-м году в Берлине доктор Роберт Кох объявил об открытии этой страшной болезни, которая до сих пор угрожает каждому из нас.

В Алматы состоялся международный семинар по вопросам борьбы с туберкулезом. Это инициатива правительства Казахстана. Казахстан за последние годы проявил себя в качестве лидера в реализации программ по борьбе с туберкулезом.

Как отметили на семинаре, борьба с туберкулезом – приоритетное направление современной медицины. Врачи считают, что самая опасная форма этого заболевания - туберкулез с «множественной лекарственной устойчивостью». Он не поддается лечению наиболее распространенными препаратами. Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения этой формой туберкулеза страдают почти 15 процентов всех больных в центрально-азиатском регионе. За январь-сентябрь 2010 года в Казахстане уровень заболеваемости туберкулезом снизился по сравнению с аналогичным периодом прошлого года со 126,4 случаев до 110,7 на 100 тыс. населения, констатируют в министерстве здравоохранения.

Анализ эпидемиологической ситуации по туберкулезу в гражданском секторе здравоохранения страны по итогам девяти месяцев также снижен показатель смертности от туберкулеза: если в 2008 году на 100 тыс. человек было зарегистрировано порядка 17 случаев, то в 2010 году – чуть более 12 фактов на 100 тыс. человек, указывается в пресс-