

Л.Н. Чуркина, Л.В. Авдеева, С.И. Войчук, Л.В. Ярошенко

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

### ИЗМЕНЧИВОСТЬ СВОЙСТВ *PSEUDOMONAS BATUMICI* 17/20 ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

Изучена изменчивость свойств и антибиотической активности, а также выживаемость клеток *Pseudomonas batumici* 17/20 – продуцента батумина (антистафилококково-го антибиотика) после длительного хранения под слоем вазелинового масла. Исследованы основные культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства мутантного штамма. Показано, что хранение под вазелиновым маслом позволяет сохранить высокий уровень антибиотической активности, синтез батумина продуцентом составлял 150 мг/л. При этом происходит снижение выживаемости клеток на два порядка через 5 лет хранения. Сформулированы условия поддержания штамма.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas batumici*, хранение, антибиотическая активность, жизнеспособность.

Антибиотик батумин был выделен из штамма почвенных бактерий *Pseudomonas batumici* в Институте микробиологии и вирусологии НАН Украины [6]. Недостатком природного штамма-продуцента был низкий уровень биосинтеза антибиотика (20–25 мг/л). Для промышленного производства необходимо увеличение уровня биосинтеза антибиотика. Комбинированным мутагенезом (УФ облучением и нитрозогуанидином) был получен мутантный штамм *Pseudomonas batumici* 17 с повышенной биосинтетической активностью [3]. Этот штамм использовался для наработки батумина в условиях полупромышленного производства. Одним из условий успешного поддержания биосинтетической активности и жизнеспособности продуцентов антибиотиков является подбор методов хранения, способствующих сохранению всех свойств штаммов. В коллекциях культур микроорганизмов исходные свойства штаммов поддерживаются преимущественно путем субкультивирования, хранения под слоем вазелинового масла, в лиофильно высушенном состоянии, при низких и ультранизких температурах [2]. Тем не менее известно, что даже при содержании микроорганизмов в анабиотическом состоянии не удается достичь полной стабилизации свойств культур. Это объясняется влиянием факторов окружающей среды на биологические структуры клеток в период хранения, в результате чего происходит изменение физиолого-биохимических особенностей продуцентов, обусловленное возникновением диссоциантов и биосинтетической активностью. Поэтому целью настоящего исследования было изучение таксономических признаков, жизнеспособности и антибиотической активности мутантного штамма *Pseudomonas batumici* 17 при длительном хранении под слоем вазелинового масла.

**Материалы и методы.** *Объекты исследования.* Использовали высокоактивный вариант *Pseudomonas batumici* 17/20, который был выделен нами при расщеплении мутантного штамма *Pseudomonas batumici* 17. Пробирки с 5–7 мл полужидкого МПА (МПА, содержащий 0,5 % агара) инокулировали культурой *Pseudomonas batumici* 17/20, инкубировали 48 час при 26 °С, далее наслаивали в каждую пробирку 2–3 мл стерильного вазелинового масла, после чего хранили при комнатной температуре 5 лет. Контролем служил исходный штамм *P. batumici* УКМ В-303. У штаммов 17/20 и УКМ В-303 изучали морфологические и культуральные свойства, наличие оксидазы (окисление диметилпарафенилендиамина) [7], способность использовать различные органические соединения в качестве единственного источника углерода на агаризованной среде Козера [8]. Содержание источников углерода в среде составляло 0,1 %.

*Электронная микроскопия.* Клетки отмывали от остатков питательной среды, трижды центрифугировали (5000g, 5 мин) и ресуспендировали в 0,1М фосфатном

буфере Соренсона (рН 7,2). Полученную суспензию наносили на медные сеточки, покрытые формварной пленкой и через 10 мин излишки суспензии убирали фильтровальной бумагой. Сеточки трижды промывали водой и просушивали при комнатной температуре. Образцы анализировали методом трансмиссионной электронной микроскопии с помощью микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония) при напряжении 80 кВ [5].

*Определение чувствительности* к широкому спектру антибиотиков исходного и мутантного штаммов *Pseudomonas batumici* проверяли диск-диффузионным методом Керби-Бауэра [9].

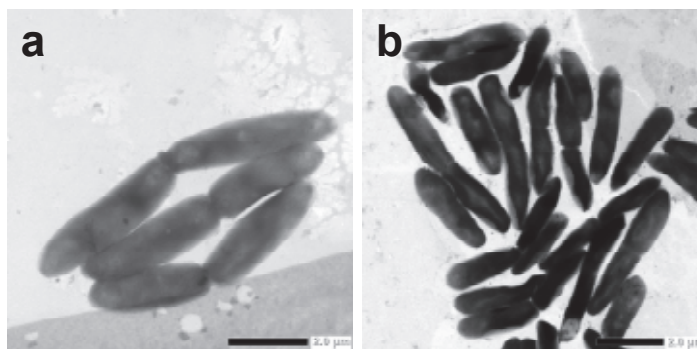
*Жизнеспособность клеток* после 2-х и 5-ти лет хранения, а также до хранения определяли методом подсчета колоний при расसेве на МПА.

*Для изучения изменчивости* антибиотической активности бактерии *Pseudomonas batumici* 17/20 инокулировали в синтетическую среду [3] и культивировали на качалке (220 об/мин) в пробирках при температуре 25 °С (72 ч). Активность клонов *P. batumici* по синтезу батумина проверяли методом диффузии в агар, используя в качестве тест-культуры высокочувствительный к батумину штамм *Staphylococcus aureus* 209Р (УКМ В-918, АТСС 6538Р). В зависимости от диаметра зоны задержки роста стафилококков клоны *P. batumici* условно разделяли на малоактивные (МА) – зона 5-20 мм, активные (А) – 20-30 мм, с повышенной активностью (ПА) – 30-40 мм, высокоактивные (ВА) – 40-60 мм.

*Концентрацию антибиотика* в культуральной жидкости определяли количественно спектрофотометрическим методом [4].

**Результаты и обсуждение.** Сравнительное изучение морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств мутантного штамма *Pseudomonas batumici* 17/20 и исходного штамма *P. batumici* В-303 показало, что оба штамма на МПА образуют круглые, прозрачные колонии; клетки – грамотрицательные палочки, имеют от 1 до 5 жгутиков, оксидазоположительные; строгие аэробы, используют глюкозу только по окислительному пути. Изученные штаммы *P. batumici* не образовывали поли-β-оксимасляную кислоту.

Электронно-микроскопические исследования показали, что размер клеток мутантного штамма больше, чем исходного и составляет для *Pseudomonas batumici* 17/20 –  $3,9 \times 1,0 \pm 0,2$  мкм, для исходного штамма *P. batumici* В-303 –  $3,0 \times 0,9$  мкм (рис. 1).



**Рис. 1.** Электронная микроскопия мутантного штамма *Pseudomonas batumici* 17/20 (а) и исходного «дикого штамма» *P. batumici* В-303 (б)

При первичном описании штамма-продуцента батумина – нового антистафилококкового антибиотика [1] было показано наличие пигмента феназиновой группы – феназин-1-карбоновой кислоты. У мутантного штамма *P. batumici* 17, с повышенной биосинтетической активностью, отсутствовала способность пигментообразования.

На синтетической среде Козера оба штамма (17/20 и В-303) в качестве единственного источника углерода использовали органические соединения разнообразного химического строения, в том числе, углеводы (d-глюкозу, l-арабинозу, d-маннозу, d-галактозу, d-фруктозу), органические кислоты, среди них метаболиты цикла

Кребса (янтарную, малоновую,  $\alpha$ -кетоглutarовую, аконитовую, яблочную), полиспирты и гликоли (маннит, инозит, глицерин), аминокислоты ( $\alpha$ -аланин, изолейцин, валин, орнитин, цитруллин, пролин, гистидин), азотистые соединения (саркозин). В отличие от дикого штамма мутантный штамм *Pseudomonas batumici* 17/20 в процессе длительного хранения утратил способность усваивать фумарат, никотиновую кислоту, бензоат Na, капрат как единственные источники углерода.

Мутантный штамм, как и исходный, после хранения под слоем вазелинового масла остался чувствительным к таким аминогликозидным антибиотикам как стрептомицин, канамицин, неомицин, тетрациклин и резистентным к антибиотикам пенициллинового ряда – бензилпенициллин, ампициллин, ристомицин, а также к рифампицину, линкомицину, полимиксину (табл.).

Таблица

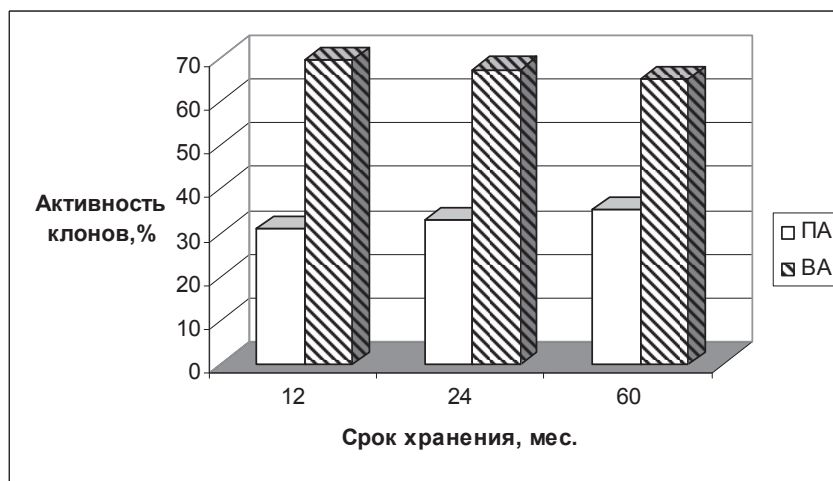
**Чувствительность к антибиотикам исходного и мутантного штаммов *Pseudomonas batumici***

Штаммы <i>P. batumici</i>	бензилпенициллин	ампициллин	оксациллин	карбенициллин	стрептомицин	канамицин	неомицин	мономицин	гентамицин	тетрациклин	левомицетин	эритромицин	олеандомицин	ристомицин	рифампицин	линкомицин	полимиксин
	Зоны задержки роста, мм																
В-303	10	8	6	6	28	30	28	27	30	30	30	15	6	6	15	6	6
17	13	10	6	6	28	30	25	28	30	30	32	20	6	6	12	6	6

Поскольку стабильность уровня синтеза антибиотиков имеет важное практическое значение, нами была проведена работа по изучению изменчивости клонов штамма-продуцента батумина при его хранении на полужидком МПА под слоем вазелинового масла.

Ранее нами было показано, что популяция мутантного штамма *P. batumici* 17 имеет следующее распределение клонов по степени антибиотической активности: МА –  $3,1 \pm 2,1$  %, А –  $9,3 \pm 2,5$  %, ПА –  $44,3 \pm 1,4$  %, ВА –  $43,3 \pm 2,8$  %. [3]. Для изучения дальнейшей возможности хранения продуцента батумина под слоем вазелинового масла нами при многократных посевах мутантного штамма *P. batumici* 17 был выделен высокоактивный вариант *P. batumici* 17/20. В популяции этого варианта отсутствовали малоактивные и активные клоны, а доминировали клоны с повышенной активностью ( $30,8 \pm 3,1$  %) и высокоактивные ( $69,2 \pm 3,4$  %). Такое соотношение клонов в популяции обеспечивало синтез батумина на уровне 170 мг/л. Через год хранения наблюдалась аналогичная картина. Использованный метод хранения на этом этапе не влиял на стабильность синтеза антибиотика. Однако через 24 месяца проявилась тенденция к незначительному уменьшению удельного веса высокоактивных клеток. Наблюдалось расщепление клеток в популяции по антибиотической активности: у  $67,1 \pm 2,1$  % клонов сохранялась способность задержки роста тест-культуры до 50-60 мм (диаметр зоны), у  $32,9 \pm 1,9$  % клонов – до 35-40 мм. После 60 месяцев хранения проверка клонов *P. batumici* 17/20 показала неодинаковый уровень биосинтеза антибиотика отдельными клетками. В популяции по-прежнему доминировали высокоактивные ( $64,9 \pm 3,1$  %) клоны, хотя тенденция к уменьшению их удельного веса очевидна. Клоны с повышенной активностью составляли  $35,1 \pm 2,4$  % (рис. 2).

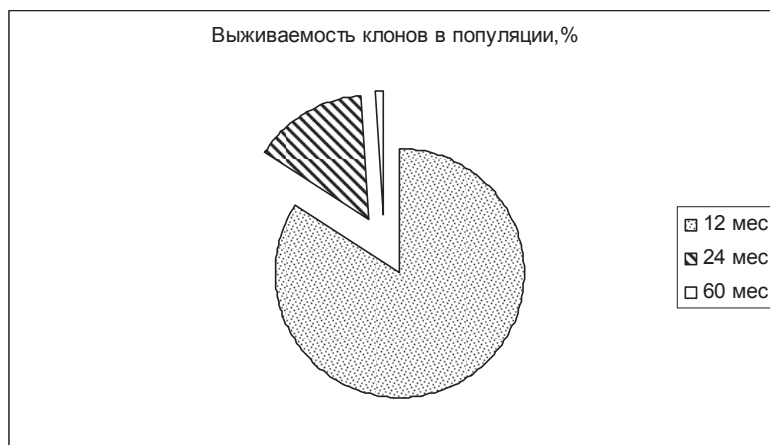
Таким образом, уровень антибиотической активности *P. batumici* 17/20 незначительно изменился после 5-ти лет хранения под слоем вазелинового масла. Синтез батумина продуцентом составлял 150 мг/л. Поэтому данный метод может быть использован для сохранения уровня активности продуцента батумина *P. batumici*.



**Рис. 2. Изменчивость степени активности клонов *P. batumici* 17/20 после различных сроков хранения под слоем вазелинового масла.**

Результаты исследований позволяют сформулировать условия поддержания штамма: при долгосрочном хранении под слоем вазелинового масла высокоактивного варианта *P. batumici* 17/20 следует использовать полужидкий МПА, а посевной материал готовить только из предварительно отобранных высокоактивных колоний с диаметром зоны задержки роста тест-культур 60 мм.

Следующим этапом нашей работы было определение жизнеспособности клеток *P. batumici* 17/20 при хранении под слоем вазелинового масла. После 12 месяцев хранения наблюдалась тенденция к снижению количества жизнеспособных клеток. Так, через 24 месяца количество жизнеспособных клеток снизилось на один порядок, после 60 месяцев – на два порядка (рис. 3), но даже при таком показателе в полужидком МПА присутствуют не менее  $(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^7$  клеток/мл.



**Рис. 3. Количество жизнеспособных клеток *P. batumici* 17/20 (в % к начальному количеству) после различных сроков хранения под слоем вазелинового масла.**

Таким образом, уровень антибиотической активности высокоактивного варианта *P. batumici* 17/20 практически не изменился после 5 лет хранения под слоем вазелинового масла, при этом число жизнеспособных клеток в популяции снизилось на два порядка. Этот метод является благоприятным для поддержания активности штамма-продуцента батумина.

Л.М. Чуркіна, Л.В. Авдєєва, С.І. Войчук, Л.В. Ярошенко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

**МІНЛИВІСТЬ ВЛАСТИВОСТЕЙ  
PSEUDOMONAS BATUMICI 17/20 ПІСЛЯ ТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ**

Резюме

Вивчена мінливість властивостей і антибіотичної активності, а також виживання клітин *Pseudomonas batumici* 17/20 – продуцента батуміну (антистафілококового антибіотика) після тривалого зберігання під шаром вазелінової оливи. Досліджені основні культурально-морфологічні і фізіолого-біохімічні властивості мутантного штаму. Показано, що зберігання під вазеліновою оливою дозволяє зберегти високий рівень антибіотичної активності, синтез батуміну продуцентом складає 150 мг/л. При цьому через 5 років зберігання відбувається зниження виживання клітин на два порядки. Сформульовані умови підтримки штаму.

Ключові слова: *Pseudomonas batumici*, зберігання, антибіотична активність, життєздатність.

L.N. Churkina, L.V. Avdeeva, S. I. Voychuk, L.V. Yaroshenko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

**PSEUDOMONAS BATUMICI 17/20 PROPERTIES VARIABILITY AFTER  
LONG-TERM STORAGE**

Summary

Variability of properties and antibiotic activity, as well as cells survival of *Pseudomonas batumici* 17/20 – the producer of batumin (antistaphylococcal antibiotic) after long-term storage under vaseline oil layer have been studied. The main culture-morphological and physiological biochemical properties of the mutant strain have been investigated. It has been shown that storage under vaseline oil allows to preserve high level of antibiotic activity: batumin synthesis by the producer was 150 mg/l. Therewith, the survival of cells decreases by two orders during 5 years of storage. The conditions of strain maintenance have been formulated.

The paper is presented in Russian.

К е у w o r d s: *Pseudomonas batumici*, storage, antibiotic activity, variability.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Churkina L.N., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Кіпріанова О.А., Бойко О.І., Рабінович А.С., Айзенман Б.Ю. Комплекс антибіотичних речовин, утворюваних *Pseudomonas* species // Мікробіол. журн. – 1974. – 36, №6. – С. 781–783.
2. Сидякіна Т.М. Консервация микроорганизмов в коллекциях культур. Методы. Проблемы. Перспективы. – Пушино, 1991. – С. 81–159.
3. Смирнов В.В., Чуркіна Л.Н., Перепныхатка В. И., Муквич Н.С., Гарагуля А.Д., Кіпріанова Е.А., Кравец А.Н., Довженко С.А. Получение высокоактивного штамма-продуцента антистафилококкового антибиотика батумина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – 36, № 1. – С. 55–58.
4. Чуркіна Л.Н., Кравец А.Н., Клочко В.В. Влияние индуцирующих и селективных агентов на биосинтез нового антистафилококкового антибиотика батумина //Биополимеры и клетка. – 2007. – 23, № 2. – С. 108–114.
5. Bozzola J.J. Conventional Specimen Preparation Techniques for Transmission Electron Microscopy of Cultured Cells: Electron Microscopy: Methods and Protocols. 2nd ed. / Ed. by John Kuo. – 2007. – P. 1–18.
6. Esipov S.E., Kiprianova E.A. Batumin, a novel antibiotic produced by *Pseudomonas batumici* nov. sp. 3187 // 5<sup>th</sup> Int. Conf. on Chemical Synthesis of Antibiotics and Related Microbial Products. – Hungarian Acad. Sci., Budapest, 1996. – Abstr. – P. 14.
7. Kovacz N. Identification of *P. picianea* by the oxidase reaction // Nature. – 1956. – N 178. – P.703
8. Stanier R., Palleroni N., Doudoroff M. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study // J. Gen. Microbiol. – 1966. – 43, N 2. – P. 159–271.
9. Vandepitte J., Engback K., Piot P., Heuck C.C. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии: Пер. с англ. – М.: Медицина, 1994.

Отримано 15.09.2012