

Л. М. Чуркіна, Л. В. Авдєєва, Л. В. Ярошенко

Ефективність різних способів зберігання продуцента антистафілококового антибіотика батуміну, перспективного для промислового виробництва

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Б. П. Мацелюхом)

Вивчено мінливість властивостей і антибіотичної активності, а також виживаність клітин *Pseudomonas batumici* — продуцента антибіотика батуміну (антистафілококового антибіотика) після тривалого зберігання як під шаром вазелінового масла, так і в ліофілізованому стані. Досліджені основні морфологічні й фізіолого-біохімічні властивості мутантного штаму. Встановлено, що обидва способи зберігання забезпечували високий рівень антибіотичної активності штаму-продуцента — 160–170 мг/мл, при цьому спосіб зберігання в ліофілізованому стані забезпечував більш високий рівень виживання клітин в популяції. Метод ліофілізації продуцента дозволить створити банк культур з високою біосинтетичною активністю, які можуть протягом тривалого часу забезпечувати виробництво гарантованим посівним матеріалом.

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

Антистафілококовий антибіотик батумін був виділений зі штаму *Pseudomonas batumici* 3187 в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України [1]. Недоліком природного штаму-продуцента був низький рівень біосинтезу антибіотика (20–25 мг/л). Комбінованим мутагенезом (УФ-опроміненням і нітрозогуанідинном) отримано мутантний штам *P. batumici* 17 з підвищеною біосинтетичною активністю [2], який використовувався для напрацювання батуміну в умовах напівпромислового виробництва.

Важливе значення для промислового напрацювання антибіотиків — підбір методів зберігання біосинтетичної активності і життєздатності продуцентів. Причинами зниження життєздатності культур та їх активності в процесі зберігання є зміна структури мікробної популяції під дією ряду факторів зовнішнього середовища та збільшення в популяції продуцентів неактивних дисоціантів [3].

На сучасному етапі використовуються методи зберігання продуцентів антибіотиків, які забезпечують їх довготривале перебування в активному стані. В основу цих методів покладений принцип затримки розвитку мікроорганізмів, тобто принцип консервації. Для кожного виду продуцента повинен бути підібраний свій, найбільш оптимальний, метод такої консервації, який був би здатний зберігати штам-продуцент в активному стані.

Мета дослідження — порівняння ефективності різних способів довготривалого зберігання продуцента антибіотика батуміну.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження слугували вихідний штам *P. batumici* 3187 (УКМ В-303) і мутантний *P. batumici* 17. Штами зберігали в ліофілізованому стані при температурі +5...10 °С, а також на 0,5% МПА (м'ясопептонний агар) під шаром вазелінового масла впродовж 5-ти років. Вивчалися морфологічні й культуральні властивості штамів, наявність оксидази, здатність використовувати різні органічні сполуки як єдине джерело

вуглецю на агаризованому середовищі Козера [4, 5]. Вміст джерел вуглецю в середовищі становив 0,1%.

Визначення чутливості до широкого спектра антибіотиків вихідного і мутантного штамів *P. batumici* перевіряли диск-дифузійним методом Кербі–Бауера [6].

Життєздатність клітин після 5-ти років зберігання визначали методом підрахунку колоній при розсіванні на МПА. Мінливість антибіотичної активності бактерії *P. batumici* 17/20 вивчали шляхом культивування продуцента (220 об/хв) у пробірках при температурі 25 °С (72 год) [2].

Активність клонів P. batumici в процесі синтезу батуміну перевіряли методом дифузії в агар, використовуючи як тест-культуру високочутливий до батуміну штам *Staphylococcus aureus* 209P (УКМ В-918, АТСС 6538P). Залежно від діаметра зони затримки росту стафілококів, клони *P. batumici* умовно розділяли на малоактивні (МА) — зона 5–20 мм, активні (А) — 20–30 мм, з підвищеною активністю (ПА) — 30–40 мм, високоактивні (ВА) — 40–60 мм.

Концентрацію антибіотика в культуральній рідині визначали кількісно методом спектрофотометрії [7].

Статистичний аналіз вірогідності різниці між середніми значеннями виконано за *t*-критерієм Стьюдента, рівень значущості вибрано за $p = 0,05$.

Результати та їхнє обговорення. Порівняльне вивчення морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей мутантного *P. batumici* 17/20 і вихідного *P. batumici* В-303 штамів показало, що досліджувані штами на МПА утворюють круглі, прозорі колонії; клітини — грамнегативні палички (2,2·1,0 мкм), рухомі за допомогою кількох (частіше двох) полярних джгутиків, оксидазопозитивні; строгі аероби, що використовують глюкозу лише по окиснювальному шляху.

Аналіз первинного опису штаму-продуцента батуміну — нового антистафілококового антибіотика [8] показав наявність пігменту феназинової групи — феназин-1-карбонової кислоти. В мутантного штаму *P. batumici* 17 була відсутня здатність до пігментоутворення.

На синтетичному середовищі Козера досліджувані штами як єдине джерело вуглецю використовували органічні сполуки різної хімічної будови, у тому числі вуглеводи: d-глюкозу, l-арабінозу, d-манозу, d-галактозу, d-фруктозу, органічні кислоти, серед них метаболіти циклу Кребса (бурштинову, малонову, l-кетоглутарову, яблучну), поліспирти й гліколи (маніт, інозит, гліцерин), амінокислоти (аланін, ізолейцин, валін, орнітин, цитрулін, пролін, гістидин), азотисті сполуки (саркозин). На відміну від дикого штаму *P. batumici* В-303, мутантний штам *P. batumici* 17/20 у процесі тривалого зберігання в ліофілізованому стані, а також під шаром вазелінового масла втратив здатність засвоювати фумарат, ніотинову кислоту, бензоат натрію, капрат як єдині джерела вуглецю.

Штами *P. batumici* (вихідний і мутантний) при тривалому зберіганні в ліофілізованому стані, а також під шаром вазелінового масла залишилися чутливими до аміноглікозидних антибіотиків — стрептоміцин, канаміцин, неоміцин, тетрациклін і резистентними до антибіотиків пеніцилінового ряду — бензилпеніцилін, ампіцилін, рістоміцин, а також до рифампіцину, лінкоміцину, поліміксину (табл. 1).

Оскільки стабільність рівня синтезу антибіотиків має важливе практичне значення, нами проведено роботу по вивченню мінливості клонів штаму-продуцента батуміну при його зберіганні на напіврідкому МПА під шаром вазелінового масла, а також в ліофілізованому стані.

Раніше [2] було встановлено, що популяція мутантного штаму *P. batumici* 17 має такий розподіл клонів за ступенем антибіотичної активності: МА — (3,1 ± 2,1)%, А — (9,3 ± 2,5)%,

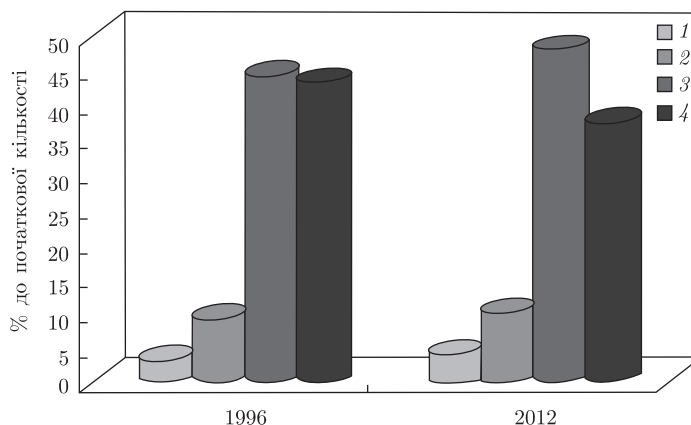


Рис. 1. Розподіл клонів по активності у *P. batumici* 17 після довготривалого зберігання (16-ти років) у ліофілізованому стані.

Умовні позначення: 1 – МА; 2 – А; 3 – ПА; 4 – ВА

ПА – $(44,3 \pm 1,4)\%$, ВА – $(43,3 \pm 2,8)\%$. Культура зберігала рівень синтезу батуміну 100–120 мг/л. Звертають на себе увагу результати розподілу клонів за активністю після 16-ти років зберігання в ліофілізованому стані. В популяції домінували клони з ПА $(48 \pm 1,8)\%$, ВА становили $(37,5 \pm 2,4)\%$ (рис. 1). Культура зберігала рівень синтезу батуміну 87–100 мг/л.

Досить висока стабільність синтезу батуміну штамом-продуцентом після його довготривалого зберігання переконливо підтверджує раніше отримані результати про хромосомну локалізацію генів, відповідальних за синтез антибіотика [9].

При багаторазових розсівах мутантного штаму *P. batumici* 17 був виділений високоактивний варіант *P. batumici* 17/20. У популяції цього варіанта були відсутні МА й А клони, а домінували клони з ПА $(30,8 \pm 3,1)\%$ й ВА $(69,2 \pm 3,4)\%$. Таке співвідношення клонів у популяції забезпечувало синтез батуміну на рівні 170–200 мг/л.

Надзвичайно важливим було підібрати оптимальні умови зберігання високоактивного варіанта 17/20.

Через рік зберігання під шаром вазелінового масла співвідношення клонів за активністю в популяції штаму-продуцента залишалося незмінним. Використаний метод зберігання на цьому етапі не впливав на стабільність синтезу антибіотика. Проте через 24 міс. було виявлено тенденцію до незначного зменшення питомої ваги високоактивних клітин. Спостерігалось подальше розщеплення клітин у популяції за антибіотичною активністю: $(67,1 \pm 2,1)\%$ зберігали здатність затримки росту тест-культури до 50–60 мм (діаметр зони),

Таблиця 1. Чутливість до антибіотиків вихідного і мутантного штамів *Pseudomonas batumici*

Штами	бензилпеніцилін	ампіцилін	оксацилін	карбеніцилін	стрептоміцин	канаміцин	неоміцин	мономіцин	гентаміцин	тетрациклін	левоміцетин	еритроміцин	олеандоміцин	рістомицин	рифаміцин	лінкоміцин	поліміксин
	Зони затримки росту, мм																
B-303	10	8	6	6	28	30	28	27	30	30	30	15	6	6	15	6	6
17/20	13	10	6	6	28	30	25	28	30	30	32	20	6	6	12	6	6

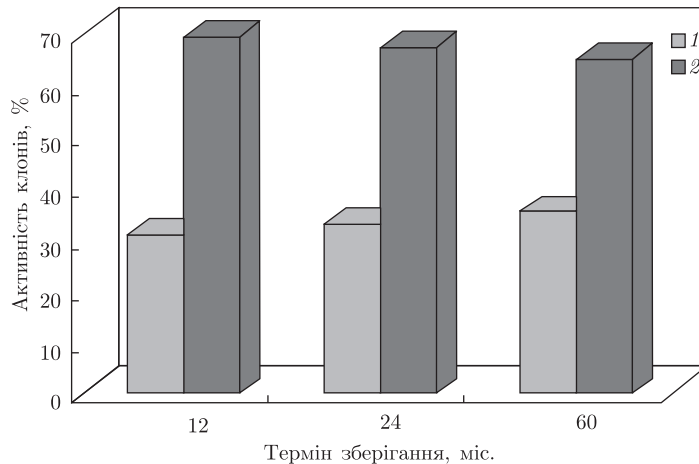


Рис. 2. Мінливість ступеня активності клонів *P. batumici* 17/20 за різних термінів зберігання під шаром вазелінового масла.

Умовні позначення: 1 — ПА; 2 — ВА

в $(32,9 \pm 1,9)\%$ клонів до 35–40 мм. Після 60 міс. зберігання перевірка клонів *P. batumici* 17/20 показала різний рівень біосинтезу антибіотика окремими клітинами. У популяції, як і раніше, домінували ВА клони $(64,9 \pm 3,1)\%$, хоча тенденція до зменшення їх питомої ваги очевидна. Клони з ПА становили $(35,1 \pm 2,4)\%$ (рис. 2).

Таким чином, рівень антибіотичної активності *P. batumici* 17/20 незначно змінився після 5-ти років зберігання під шаром вазелінового масла і становив 150–160 мг/л. Тому даний метод може бути використаний для збереження рівня активності продуцента батуміну.

Результати досліджень дають змогу сформулювати умови підтримки штаму: при довготривалому зберіганні під шаром вазелінового масла високоактивного варіанта *P. batumici* 17/20 слід використовувати напіврідкий МПА, а посівний матеріал готувати лише із попередньо відібраних ВА колоній з діаметром зони затримки росту тест-культури 60 мм.

При зберіганні *P. batumici* 17/20 в ліофілізованому стані нами отримано аналогічні результати. Після 12 міс. зберігання співвідношення клонів за активністю в популяції штаму-продуцента залишалося незмінним, через 24 — в популяції домінували ВА клони — $(66,2 \pm 2,4)\%$, клони з ПА становили $(33,8 \pm 2,4)\%$. Через 60 міс. виявилася незначна тенденція до зменшення питомої ваги ВА клонів — $(64,4 \pm 1,4)\%$ (рис. 3). Біосинтетична активність штаму 160–170 мг/л.

Наступний етап нашої роботи — визначення життєздатності клітин *P. batumici* 17/20 за різних способів зберігання.

При зберіганні в ліофілізованому стані впродовж 60 міс. кількість життєздатних клітин становила $(247 \pm 0,45) \cdot 10^6$ кл/мл, у той самий час під шаром вазелінового масла — $(21 \pm 0,23) \cdot 10^6$ кл/мл (рис. 4).

Таким чином, обидва способи зберігання як під шаром вазелінового масла, так і в ліофілізованому стані забезпечували високий рівень антибіотичної активності штаму-продуцента *P. batumici* 17/20, при цьому спосіб зберігання в ліофілізованому стані забезпечував більш високий рівень виживання клітин у популяції. Спираючись на власний досвід, а також на дані літературних джерел [10], вважаємо, що метод ліофілізації культури є сучасним, надійним та може бути рекомендований для гарантованого зберігання штаму-продуцента при виробництві батуміну. До того ж ліофілізація продуцента дозволить створити банк

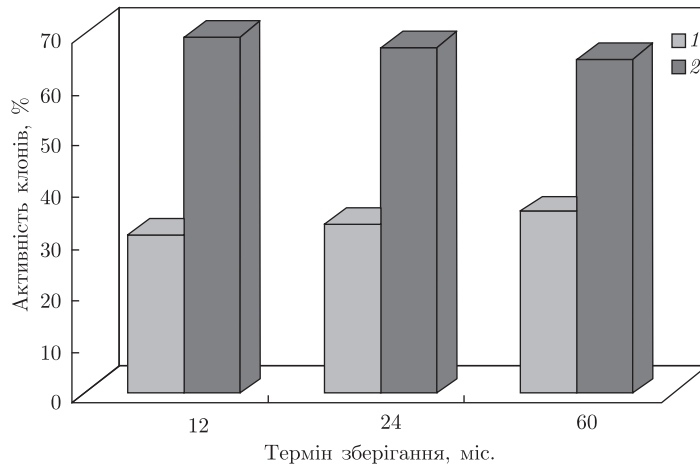


Рис. 3. Мінливість ступеня активності клонів *P. batumici* 17/20 за різних термінів зберігання в ліофілізованому стані.

Умовні позначення: 1 — ПА; 2 — ВА

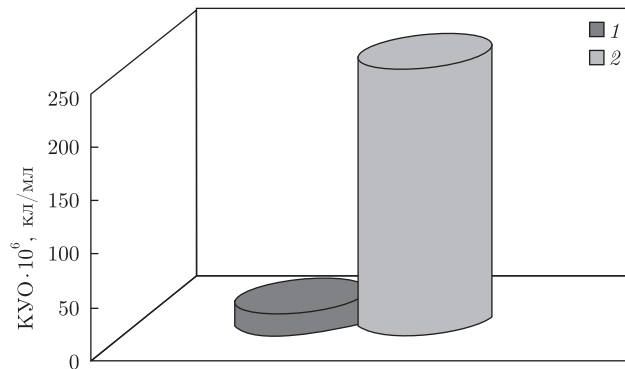


Рис. 4. Кількість життєздатних клітин *P. batumici* 17/20 після довготривалого зберігання під шаром вазелинового масла та в ліофілізованому стані.

Умовні позначення: 1 — вазелинове масло; 2 — ліофілізація

активних культур — культур з високою біосинтетичною активністю, які можуть протягом тривалого часу забезпечувати виробництво гарантованим посівним матеріалом.

Цитована література

1. *Esipov S. E., Kiprianova E. A.* Batumin, a novel antibiotic produced by *Pseudomonas batumici* nov. sp. 3187 // 5th Int. Conf. on Chemical Synthesis of Antibiotics and Related Microbial Products. – Budapest: Hungarian Acad. Sci., 1996. – Abstr. – P. 14.
2. *Смирнов В. В., Чуркина Л. Н., Перепныхатка В. И., Муквич Н. С., Гарагуля А. Д., Киприанова Е. А., Кравец А. Н., Довженко С. А.* Получение высокоактивного штамма-продуцента антистафилококкового антибиотика батумина // Прикл. биохимия и микробиология. – 2000. – **36**, № 1. – С. 55–58.
3. *Сидякина Т. М.* Консервация микроорганизмов в коллекциях культур // Методы. Проблемы. Перспективы. – Пушино: Б. и., 1991. – С. 81–159.
4. *Kiprianova E. A., Klochko V. V., Zelena L. B., Churkina L. N., Avdeeva L. V.* *Pseudomonas batumici* sp. nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast // Мікробіол. журн. – 2011. – **73**, No 5. – С. 3–8.
5. *Palleroni N. J.* Genus I. *Pseudomonas* // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. / Ed. G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. – Berlin: Springer, 2005.

6. Vandepitte J., Engback K., Piot P., Heuck C. C. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии: Пер. с англ. – Москва: Медицина, 1994.
7. Чуркина 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.
8. Смирнов В. В., Киприанова Е. А. Бактерии рода *Pseudomonas* / Под ред. Б. Е. Айзенмана. – Киев: Наук. думка, 1990. – С. 87–90.
9. Смирнов В. В., Чуркина Л. Н., Кравец А. Н., Гарагуля А. Д. Некоторые особенности биосинтеза нового антистафилококкового антибиотика батумина // Антибиотики и химиотерапия. – 1993. – **38**, № 4/5. – С. 3–6.
10. Цуцаева А. А., Ананьина А. Е. Изучение влияния некоторых параметров процесса лиофилизации на жизнеспособность споровой культуры *Streptomyces fradiae* ВНИИГ-25А // Пробл. криобиологии. – 2002. – № 2. – С. 26–29.

References

1. Esipov S. E., Kiprianova E. A. 5th Int. Conf. on Chemical Synthesis of Antibiotics and Related Microbial Products, Budapest: Hungarian Acad. Sci., 1996: 14.
2. Smirnov V. V., Churkina L. N., Perepnikhatka V. I., Mukvich N. S., Garagulya A. D., Kiprianova E. A., Kravetz A. N., Dovzhenko S. A. Appl. Biochem. and Microbiol., 2000, **36**, No 1: 55–58 (in Russian).
3. Sidiyakina T. M. Methods. Prospects. Problems, Pushchino, 1991: 81–159 (in Russian).
4. Kiprianova E. A., Klochko V. V., Zelena L. B., Churkina L. N., Avdeeva L. V. Mikrobiol. Zh., 2011, **73**(5): 3–8.
5. Palleroni N. J. Genus I. Pseudomonas. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, Ed. G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, Berlin: Springer, 2005.
6. Vandepitte J., Engback K., Piot P., Heuck C. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, Geneva: WHO Library, 1991.
7. Churkina L. N., Kravets A. N., Klochko V. V. Biopolymers and cell, 2007, **23**, No 2: 108–114 (in Russian).
8. Smirnov V. V., Kiprianova E. A. Bacteria of the *Pseudomonas* genus, Ed. B. E. Aizenman, Kiev: Naukova Dumka, 1990: 87–90 (in Russian).
9. Smirnov V. V., Churkina L. N., Kravetz A. N., Garagulya A. D. Antibiotics and Chemotherapy, 1993, **38**, No 4/5: 3–5 (in Russian).
10. Tsutsaeva A. A., Ananyina A. Ye. Probl. cryobiol., 2002, No 2: 26–29 (in Russian).

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

Надійшло до редакції 03.02.2015

Л. Н. Чуркина, Л. В. Авдеева, Л. В. Ярошенко

Эффективность разных способов хранения продуцента антистафилококкового антибиотика батумина, перспективного для промышленного производства

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

*Изучена изменчивость свойств и антибиотической активности, а также выживаемость клеток *Pseudomonas batumici* – продуцента антибиотика батумина (антистафилококкового антибиотика) после длительного хранения как под слоем вазелинового масла, так и в лиофилизированном состоянии. Исследованы основные морфологические и физиолого-биохими-*

ческие свойства мутантного штамма. С использованием микробиологического и спектрофотометрического методов установлено, что оба способа хранения обеспечивали высокий уровень антибиотической активности штамма-продуцента — 160–170 мг/мл, при этом способ хранения в лиофилизированном состоянии обеспечивал более высокий уровень выживания клеток в популяции. Метод лиофилизации продуцента позволит создать банк культур с высокой биосинтетической активностью, которые могут в течение длительного времени обеспечивать производство гарантированным посевным материалом.

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

L. N. Churkina, L. V. Avdeeva, L. V. Yaroshenko

The efficiency of different storage methods for a producer of antistaphylococcal antibiotic batumin promising for industrial-scale production

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kiev

Variability of properties and antibiotic activity, and the cells survival of Pseudomonas batumici, a producer of batumin (an antistaphylococcal antibiotic), after the long-term storage under a vaseline oil layer and in a lyophilized state were studied. The main morphological, physiological, and biochemical properties of the mutant strain were explored. It was found that both methods of storage provided high level of antibiotic activity of the strain-producer — 160–170 mg/ml, at that the method of storage in the lyophilized state provided higher level of cells survival in population. The method of batumin-producing strain lyophilization will allow to create a bank of cultures with high biosynthetic activity, which may provide a long-term guaranteed cell suspension production.

Keywords: *Pseudomonas batumici*, storage, antibiotic activity, variability.