

ВЛИЯНИЕ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТ И ЛИПИДО-ОБРАЗОВАНИЕ *STREPTOMYCES CANOSUS* 71

*Институт микробиологии Академии наук РМ,
ул. Академическая, 1, г. Кишинев, МД-2028, Республика Молдова*

Известно, что под воздействием различных физических факторов могут изменяться все, без исключения, характерные признаки и свойства микроорганизмов. Степень изменения зависит от вида и дозы используемого мутагена, а также от рода, вида и даже штамма микроорганизма. Кроме того, учитывая, что биохимические мутанты крайне редко возникают спонтанно, использование радиации дает возможность увеличить частоту этих мутаций [1–3].

Эффективность использования ионизирующих излучений и их влияние на наследственную изменчивость показаны на многочисленных микробных и растительных объектах [4–7]. Применение УФ и γ -лучей в селекции микроорганизмов позволило получить высокоактивные штаммы различных продуцентов биологически активных веществ [2–9].

Среди микроорганизмов как продуценты физиологически активных соединений различной химической структуры особое место занимают актиномицеты, способные синтезировать витамины группы В, свободные аминокислоты, антибиотики медицинского и немедицинского (кормового) назначения. Учитывая перспективность кормовых препаратов для животноводства уже в 70–80-е годы проводилась селекция активных вариантов актиномицетов методом экспериментального мутагенеза, в том числе и ионизирующего излучения. Это позволило выбрать в качестве промышленных вариантов мутанты актиномицетов, обладающие выраженными антибиотическими и стимулирующими свойствами для животноводства и растениеводства [10, 11].

В последние годы различные физические и химические факторы использовали для получения штаммов микроорганизмов, отличающихся повышенным синтезом липидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты. Так, например, после облучения УФ-лучами гриба *Mortierella isabelina*, содержащего в биомассе 27,0 % липидов, из которых на долю γ -линоленовой кислоты приходилось 3,3%, был получен стабильный мутант М₆, у которого в биомассе липиды составляли 32,8%, а γ -линоленовая кислота – 8,44% [12].

В доступной литературе нам не удалось встретить сообщение о получении методом экспериментального мутагенеза новых высокопродуктивных штаммов актиномицетов, отличающихся от исходных культур качественным и количественным составом липидов биомассы. В связи с этим целью исследований являлось изучение влияния γ -излучения на рост и липидообразование *Streptomyces canosus* 71.

Методика эксперимента

Объектом исследований служил музейный штамм стрептомицетов – *Streptomyces canosus* 71. Для изучения влияния ионизирующего излучения на рост и липидообразование стрептомицетов водную суспензию спор *S. canosus* 71 облучали на радиационно-химической γ -установке РХМ – γ -20 с активностью 12750 Кюри и мощностью 0,67 Гр/с. Источником γ -лучей является радиоактивный Co^{60} .

Использовали дозы 1000, 2000, 3000 и 4000 Гр. После обработки спор проводили микробиологический посев на агаризованную среду Чапека. Затем подробно изучали и описывали культуральные и морфологические особенности отличающихся от исходной культуры колоний [13].

Выбранные варианты культивировали на комплексной среде М-1 (основной источник углерода – кукурузная мука) в колбах Эрленмейера на вибростоле (180 об/мин) в течение 5 суток при 27°C. Из биомассы исследуемых вариантов экстрагировали общие липиды модифицированным методом Фолча [14].

Качественный и количественный состав липидов определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и денситометрически. Способность накапливать биомассу и продуцировать липиды при росте на комплексной среде М-1 у выбранных вариантов сравнивали на момент отбора, через 6, 12, 18 и 24 месяца.

Результаты и их обсуждение

Известно, что при селекции хозяйственно полезных форм отбор почти всегда идет по количественным признакам [2, 3]. Поэтому из выбранных и проанализированных 1200 колоний были отобраны варианты с более интенсивным окрашиванием гифов и характеризующиеся постоянством морфологических признаков после многократного пассирования. Это были варианты 3, 6, 9 и 11, которые уже на 2-й, 3-й день роста на агаризованной среде Чапека образовывали густой газон. Следует отметить, что 3, 6 и 9-й тип колоний были обнаружены после облучения суспензией спор *S. canosus* 71 в дозах 1000, 2000 и 3000 Гр, а 11-й при дозе – 3000 Гр (табл.1).

Сравнение биосинтетической активности вариантов показало, что на момент отбора по количеству биомассы 6 и 11 варианты превосходили исходную культуру *S. canosus* 71 (контроль) на 124,4 и 50,0% соответственно. 9-й вариант незначительно превосходил контроль (на 7,0%), а у 3-го варианта количество биомассы было меньше, чем у остальных вариантов (81,6 % от исходной культуры). По продукции липидов (г/л) 6 и 11-й варианты также превосходили контроль (на 98,4 и 21,0% соответственно).

При анализе данных, полученных через 6 месяцев хранения, было отмечено, что выбранные 4 варианта превосходили контроль по образованию биомассы, а 3-й вариант – по содержанию липидов в биомассе. Причем, если на момент отбора в биомассе этого варианта липиды составляли 76,5%, то через 6 месяцев – 144,8% от контроля. Посев на агаризованную среду Чапека показал, что популяция

Таблица 1. Морфология вариантов *S. canosus* 71, полученных после воздействия γ -излучения

Доза, Гр	Среда культивирования	Тип колоний	Воздушный мицелий	Субстратный мицелий	Диаметр колоний, мм	Внешний вид колоний
I, II, III	1, 2	3	белый	буроватый	0,5	карликовые, круглые
I, II, III	1, 2	6	белый	буроватый	6,0–7,0	круглые с кратером, в центре белые, по краям – светлосерые
II	2	9	грязно-серый	буроватый	2,5–3,0	округлые, в центре – равномерно-складчатые
III	2	11	сиреневый	буроватый	3,0	округлые, в центре выпуклые
Контроль	1, 2	1	белый	буроватый	3,5–4,0	форма снежинок, кратер широкий, круглый, аспорогенный, по краям колоний равномерно-складчатые
	1, 2	2	белый	буроватый	2,0–2,5	мелкие, круглые, в центре выпуклые

Примечание. Рост колоний на средах: 1 – Чапека с сахарозой; 2 – Чапека с глюкозой; дозы (Гр): I – 1000; II – 2000; III – 3000.

3-го варианта, в отличие от вариантов 6,9,11, неоднородна и состоит из 5-ти типов колоний, резко отличающихся как по форме и размерам, так и по цвету воздушного мицелия (от белого, серовато-белого, темно-серого, до землистого с белыми вкраплениями). В данном случае, вероятно, можно говорить о сезонной изменчивости этого варианта подобно той, что наблюдал Кузнецов с соавторами, у актиномицетов – продуцентов антибиотиков [15].

По мнению Дриняева, такой вариант с высокой морфологической и биосинтетической гетерогенностью непригоден в качестве продуцента, но является перспективным для селекционной работы [16].

Через 12 месяцев у трех вариантов (6, 9 и 11-й) накопление биомассы и липидов происходило следующим образом: количество биомассы составляло 247,2; 110,8 и 179,5%, а липидов – 95,3; 79,4 и 96,6 % к контролю (исходной культуре) (табл. 2).

Таблица 2. Образование биомассы и липидов у 6, 9, 11-го вариантов (в % к исходной культуре *S.canosus* 71)

Варианты	АСБ, %	Общие липиды, %	Продуктивность липидов, %
На момент отбора			
6	224,4	88,1	198,4
9	107,3	57,2	61,4
11	150,0	80,4	121,0
через 6 месяцев			
6	147,4	93,2	136,6
9	107,1	73,3	78,6
11	170,8	89,3	152,8
через 12 месяцев			
6	247,2	95,3	235,8
9	110,8	79,4	87,4
11	179,5	96,6	173,6
через 18 месяцев			
6	216,0	98,9	210,3
9	158,3	71,1	111,8
11	170,7	99,3	167,6
через 24 месяца			
6	247,4	122,1	301,2
9	116,7	81,5	95,1
11	182,4	106,5	195,1

Периодические пересевы, хранение стрептомицетов в лабораторных условиях (холодильник) в течение еще 6-ти месяцев следующим образом повлияли на биосинтетическую активность исследуемых вариантов, сохранивших за это время морфологическую однородность: было отмечено увеличение количества биомассы у варианта 9 (7,2 г/л и 11,9 г/л – 12 и 18 месяцев соответственно), а у вариантов 6 и 11-го количество биомассы осталось на прежнем уровне (16,1 и 16,2 г/л у 6-го варианта, а 11,7 и 12,7 г/л у 11-го варианта). Анализируя липидообразующую деятельность этих вариантов, было замечено, что она незначительно повысилась у варианта 6 и 11, а у 9-го варианта осталась на прежнем уровне.

Показатели биосинтетической активности исследуемых вариантов после 24-х месяцев хранения и периодических пересевов были следующие: уменьшение образования биомассы у всех изучаемых стрептомицетов (как у исходной музейной культуры, так и у 3-х вариантов, полученных после воздействия γ -излучения), и увеличение количества содержащихся в ней липидов (табл. 2).

За время эксперимента было замечено, что образование биомассы стрептомицетами происходило следующим образом: как правило, количество ее было больше, если опыты проводили в мае – июне, то есть в период наиболее благоприятный для активизации роста и размножения актиномицетов, и меньше – в позднеосенний период (конец октября – начало ноября). Результаты проведенных наблюдений согласуются с данными литературы [1, 2] и позволяют предположить, что после

воздействия на музейный штамм *S.canosus* 71 γ -излучения, удалось получить варианты, отличающиеся морфологической однородностью и относительным постоянством уровня биосинтетической активности, которая выражается следующими показателями количества биомассы: у варианта 6 на 116,0 – 147,4%, у варианта 11 на 50,0 – 82,4% и варианта 9 на 7,3 – 58,3% выше исходной культуры. Количество липидов в биомассе составляет у 6-го варианта 88,1 – 122,1%, 11-го варианта – 80,4 – 106,5%, а у 9-го варианта – 57,2 – 81,5% к исходной культуре (табл. 2).

Следующим этапом исследований было изучение качественного и количественного состава синтезируемых липидов новыми вариантами. Проведенные исследования показали, что под действием γ -излучения у *S.canosus* 71 процесс липидообразования: проявился в неизменности качественного состава при существенных количественных изменениях у основных липидных фракций (табл. 3). При разделении общих липидов, с использованием метода ТСХ было установлено, что как у исходной культуры, так и у новых вариантов липиды состояли из классов соединений, которые были идентифицированы как фосфолипиды, моно-, ди-, триглицериды, стерины и их эфиры, воска. Кроме них на хроматограммах были выявлены и две неидентифицированные фракции.

Таблица 3. Фракционный состав липидов *S.canosus* 71 и его вариантов (в % к общим липидам)

Липидные фракции	Время определения	S.canosus 71	Варианты		
			6	9	11
Фосфолипиды	1	12,8	14,5	16,7	15,3
	2	17,4	19,9	18,1	15,8
	3	12,5	15,8	16,8	15,5
	4	8,7	11,9	11,2	13,4
	5	11,9	16,4	14,1	15,1
Стерины	1	15,1	19,7	19,6	17,4
	2	15,6	19,2	19,1	15,3
	3	20,9	27,2	26,7	23,1
	4	14,5	20,5	19,5	19,6
	5	14,5	16,4	18,3	16,6
Монодиглицериды	1	17,0	15,5	21,3	21,9
	2	15,3	12,8	18,2	19,8
	3	10,2	8,9	15,6	15,1
	4	15,1	16,6	12,9	14,2
	5	19,0	17,9	22,8	15,6
Триглицериды	1	22,2	23,2	21,0	23,1
	2	26,8	27,1	15,9	19,2
	3	26,2	28,3	24,4	27,3
	4	22,3	21,9	24,0	21,8
	5	24,2	25,0	21,2	23,1
Эфиры стеринов воска	1	27,2	21,3	21,3	22,3
	2	21,6	21,1	19,2	22,0
	3	19,1	18,3	16,4	14,3
	4	15,1	13,2	16,2	16,2
	5	19,5	24,3	18,3	17,7

Примечание. Время определения: 1 – на момент отбора вариантов; 2 – через 6 месяцев; 3 – через 12 месяцев; 4 – через 18 месяцев; 5 – через 24 месяца хранения.

Культивирование исходной культуры и трех ее вариантов на сложной комплексной среде М-1 способствовало тому, что в количественном отношении преобладающими фракциями были триглицериды, суммарная фракция эфиров, стеринов и восков, а также фракция стеринов. Далее, по степени уменьшения процентного содержания в общих липидах можно назвать суммарную фракцию моно-, диглицеридов и фракцию фосфолипидов. Сравнивая эти данные с полученными нами ранее, можно отметить, что количественное соотношение основных липидных фракций у представителя так назы-

ваемой «серой» группы стрептомицетов – *S.canosus* 89 существенным образом отличается от *S.canosus* 71 и его вариантов: у *S.canosus* 89 при культивировании на комплексной мучной среде эта разница более значимая. Так, если у *S.canosus* 89 триглицериды составляют 53,7%, суммарная фракция эфиров стериннов и восков – 7,5%, стериннов – 3,9% и фосфолипидов – 1,8%, то у *S.canosus* 71 и его новых вариантов триглицериды составляют 21,2–25,0%, эфиры стериннов и воска – 17,7–24,3%, стеринны – 21,2–25,0% и фосфолипиды 11,9–16,4% (на момент завершения исследований, то есть через 24 месяца после отбора новых вариантов) (табл. 3). Это происходит, вероятно, потому, что, как известно из литературы, среда культивирования оказывает влияние на рост и липидообразование актиномицетов [1, 8, 11, 15]. Мы же в этих опытах сократили вдвое количество основного источника углерода – кукурузную муку, изменив тем самым существенный фактор – соотношение С:N, вследствие чего нейтральная фракция липидов (триглицериды) уменьшилась, а такие важные биологически активные фракции, как фосфолипиды и стеринны, отличались повышенным содержанием. Это также согласуется с литературными данными и данными, полученными нами ранее, когда под воздействием такого физического фактора, как лазерное облучение, у каротинообразующих дрожжей *Rhodotorula gracilis* K-1 отмечали увеличение содержания фосфолипидов и стериннов [17, 18]. По данным, представленным в табл. 3, у варианта 6 в общих липидах, фракция фосфолипидов за время наблюдений составляла 113,3–139,9%, у варианта 9 – 104,0–134,4%, а у варианта 11 – 90,8–154,0% по отношению к контролю (исходной культуре), а стеринны – 123,1 – 141,4%; 126,0 – 134,5% и 98,1–135,2% соответственно по вариантам.

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что под влиянием γ -излучения у *S.canosus* 71 произошли изменения в характере накопления биомассы, а также биосинтетической активности, в частности, липидообразования. В результате селекции были выбраны варианты, отличающиеся от исходной культуры не только морфологическими признаками, но и способностью более активно накапливать биомассу, в липидах которой присутствуют такие биологически активные фракции, как фосфолипиды и стеринны, количественно превышали содержание их в липидах исходной музейной культуры в среднем на 17,3–54,0% и 23,1–41,4%.

Результаты исследований показывают возможность получения новых высокопродуктивных штаммов актиномицетов, образующих биологически активные вещества липидной природы, при использовании такого физического фактора, как γ -излучение.

Автор выражает благодарность сотруднику Института Генетики АН РМ, кандидату биологических наук И.М. Романовой и сотруднику Института микробиологии И.О. Растимешиной за помощь в проведении эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красильников Н.А. Лучистые грибки. М., 1970. С. 241–242.
2. Алиханян С.И. Селекция промышленных микроорганизмов. М., 1968.
3. Алиханян С.И., Акифьев А.П. Общая генетика. М., 1985. С. 41–48.
4. Каракудиев Р.Т., Хатамов Ш., Каракудиев Т.У., Хашимов К.Х., Имамалиев А.И., Кист А.А. Влияние γ -радиации в сочетании с микроэлементами на семена хлопчатника // Радиобиология. 1986. Т.26. В.5. С. 691–695.
5. Курганова Л.Н., Анисимова А.А., Королева В.Ю. Влияние предпосевного γ -облучения семян на липидный состав мембран хлоропластов и интенсивность пероксидации у гороха // Радиобиология. 1986. Т.26. В.2. С. 273–276.
6. Никитин Д.И., Таштемирова М.А., Питрюк И.А., Сорокин В.В., Оранская М.С., Никитин Л.Е. Высокая устойчивость к ионизирующей радиации некоторых олиготрофных бактерий // Микробиология. 1993. Т.62. В.6. С. 1064–1071.
7. Gille E., Toth T.E., Florin F., Georghita G. The biosynthesis of secondary metabolites in mutagen treated medicinal plants // Roumanian Journ. of Biol. Sciences. 1997. № 5–6. V.1. P.15–16.
8. Шугаева М.Ф. Изменчивость пигментных актиномицетов. Алма-Ата, 1968.
9. Goodrich – Tanriculu M., Lin Jiam – Tsyh., Stafford A.E., Макапугай М.И., Мс Кoon Thomas A., Fuller G. Novel Neurospora crassa mutants with altered synthesis of polyunsaturated fatty acids // Microbiology. 1995. V.141. № 9. P. 2307–2314.

10. Тулемисова К.А. Индуцированная изменчивость актиномицета - продуцента кормового препарата. // Биологически активные вещества микроорганизмов. Сб.тр. Института микр. и вирусол. АН Каз.ССР. 1977. Т.22. С 64–70.
11. Музапбаров Б. Биологически активные вещества *Streptomyces antibioticus* штамм ИМБ 25/779 – стимуляторы роста цыплят. Автореф. дис. канд. биол. наук. Алма-Ата, 1987. С. 18.
12. Zhang Jun, Xiang Layin, Wang Hongmei. Weisshengwuxue tongbao // Microbiology. 1993. V.20. № 3. P. 140–143.
13. Музапбаров Б., Копытина М.Н. Способность к синтезу липидов у вариантов *Streptomyces antibioticus* и жирнокислотный состав триглицеридных фракций мелкокладчатого варианта // Тр. Института микр. и вирусол. Т.25. Алма-Ата, 1988. С. 80–89.
14. Кейтс М. Техника липидологии М., 1975. С. 384.
15. Кузнецов В.Д. Спонтанная изменчивость актиномицетов – продуцентов антибиотиков и стабилизация их биосинтетической активности и таксономических свойств: Автореф. дис. докт. биол. наук. 1975. С. 38.
16. Дрияев В.А., Стерлина Т. С., Березкина Н.Е., Мосин В.А., Кругляк Б.Б., Есинов С.Е., Кобрин М.Б., Юркив В.А. Авермектины: естественная изменчивость штамма – продуцента *Streptomyces avermectilis* ВКМ. А.с.1301.//Биотехнология. 1993. №11–12. С. 21–25.
17. Ларикова Г.А., Гальцова Р.Д. Влияние ионизирующих излучений на биосинтез липидов у дрожжевых организмов // Микробиология. 1967. Т. 36. № 6. С. 953–957.
18. Бурцева С.А. Микробные биоантиоксиданты липидной природы. Автореф. дисс.канд.биол.наук. М., 1986. С. 15.

Поступила 16.02.2000

Summary

The influence of γ -radiation on growth and lipids synthesis of on *Streptomyces canosus* 71 was studied. The strain was irradiated in four doses of γ -rays (1000 – 4000 Gy) and 12 new variants were selected. Three of them were stable in morphological properties and differed from the initial strain in the rate of biomass and lipids synthesis. The possibility of application the γ -irradiation for obtaining the new Streptomycetes strains, producing the biologically active substances (lipids) was shown.
