

Хранение культур актинобактерий — представителей родов *Streptomyces* и *Nonomuraea* методом низкотемпературной консервации

О. Н. СИНЁВА, Н. Г. КУЛИКОВА, С. Н. ФИЛИППОВА*, Л. П. ТЕРЕХОВА

НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва

*Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН, Москва

Storage of Actinobacteria of the Genera *Streptomyces* and *Nonomuraea* by Low Temperature Preservation

O. N. SINEVA, N. G. KULIKOVA, S. N. FILIPPOVA, L. P. TEREKHOVA

G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

S. N. Vinogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Исследовано влияние низкотемпературного хранения (-70°C) в течение 1,5 лет на жизнеспособность и антибиотическую активность актинобактерий *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433^T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Nonomuraea* sp. INA 34-06. Споры исследованных актинобактерий в концентрациях 10^5 — 10^7 КОЕ/мл сохраняли высокую жизнеспособность при замораживании, однако изучаемые штаммы отличались по сохранению активности в отношении тест-организма *Micrococcus luteus* ATCC 9341: колонии *S. hygroscopicus* RIA 1433^T полностью сохранили антибиотическую активность в отношении тест-организма *Micrococcus luteus* ATCC 9341, у штамма *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* наблюдалось снижение антибиотической активности на 5%, потеря антибиотической активности штаммом *Nonomuraea* sp. INA 34-06 составила 44%. При использовании суспензий с низкой концентрацией спор (10^2 КОЕ/мл) выявлены различия в устойчивости исследованных штаммов к действию низких температур: штамм *S. hygroscopicus* RIA 1433^T полностью сохранил жизнеспособность и антибиотическую активность при хранении в течение 1,5 лет, в то время как штаммы *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *N. sp.* INA 34-06 утратили жизнеспособность к 8-му месяцу хранения. Используемый в качестве криопротектора 10% раствор глицерина не влияет на жизнеспособность и антибиотическую активность данных актинобактерий.

Ключевые слова: актинобактерии, хранение культур, низкотемпературная консервация.

The influence of storage of actinobacteria *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433^T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 and *Nonomuraea* sp. INA 34-06 at extremely low temperatures (-70°C) for 1.5 years was studied with respect to their viability and antibiotic activity. The spores of the actinobacteria preserved their high viability when freeze-dried at a concentration of 10^5 — 10^7 CFU/ml. As for the antibiotic activity against the test culture *Micrococcus luteus* ATCC 9341, the strains differed: the *S. hygroscopicus* RIA 1433^T colonies preserved their antibiotic activity against the test culture, the antibiotic activity of *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* lowered by 5% and that of *N. sp.* INA 34-06 lowered by 44%. Differences in the resistance of the strains to the storage at the extremely low temperatures were observed when the suspensions contained low concentrations of the spores (10^2 CFU/ml): *S. hygroscopicus* RIA 1433^T preserved its viability and antibiotic activity during 1.5 years, while *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 and *N. sp.* INA 34-06 lost the viability by the 8th month of the storage. The study showed that 10% glycerol solution used as a cryoprotector during the storage had no effect on viability and antibiotic activity of the actinobacteria.

Key words: actinobacteria, storage, low temperature preservation.

Введение

Важное значение для лабораторных исследований актиномицетов — продуцентов антибиотических веществ имеют методы поддержания жизнеспособности микроорганизмов, позволяющие сохранять их антибиотическую активность на постоянном уровне. В настоящее время используется ряд методов сохранения культур — продуцентов

антибиотиков, обеспечивающих их длительное пребывание в активном состоянии: криоконсервация в жидком азоте, лиофилизация и низкотемпературное замораживание. В основу этих методов положен принцип задержки развития микроорганизмов — перевод клеток в состояние анабиоза, что ведёт к снижению или прекращению метаболических процессов [1—7].

Одним из современных и доступных способов хранения микроорганизмов является замораживание и хранение культур в условиях специализированных морозильников при температурах — 70°C ... 96°C [2, 4, 8]. Основными повреждающими

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: E-mail: olga.sineva81@yandex.ru

факторами при замораживании являются образование кристаллов льда, колебание осмотического давления, воздействие электролитов [4, 9–11]. Для защиты клеток от повреждения при замораживании используют специальные вещества — криопротекторы. К первому типу криопротекторов относятся глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО), которые легко проникают через мембрану и обеспечивают как внутриклеточную, так и внеклеточную защиту от замораживания. Ко второму виду криопротекторов относятся такие вещества, как сахароза, лактоза, глюкоза, маннит, сорбит, декстран, поливинилпирролидон, полиглицоль и др., которые обеспечивают защитное действие на наружной поверхности клеточной мембраны. Протекторы первого типа оказались более эффективными и пригодными для широкого круга бактерий [2, 4, 7–9, 12–14].

Криоустойчивость микроорганизмов зависит от их таксономической принадлежности, физиологического состояния, концентрации клеток, режимов криоконсервирования, наличия защитной среды, от температуры и скорости отогрева. Различной криоустойчивостью обладают микроорганизмы не только разных родов, видов, но и разных штаммов. Считается, что микроорганизмы наиболее устойчивы к замораживанию в конце логарифмической стадии роста или в начале стационарной фазы. В литературе также есть данные о том, что спорообразующие микроорганизмы более устойчивы к криозамораживанию [4–6, 8].

Как известно, адаптация микроорганизмов к условиям окружающей среды во многом зависит от состава и строения клеточной мембраны. Нормальное функционирование, стабильность клеточных мембран в первую очередь определяется физико-химическим состоянием молекул фосфолипидов — основных структурообразующих компонентов клеточных мембран [15]. Ранее нами был изучен состав липидных фракций клеточных мембран [16], кроме того, с помощью метода рентгеновской дифракции была получена информация о фазово-структурной организации фосфолипидных фракций клеточных мембран актинобактерий: *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433^T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Nonomuraea* sp. INA 34-06 в зависимости от уровня гидратации, а также стабильности основных структурных параметров липидных фракций при хранении. Было показано, что фосфолипиды *S. hygroscopicus* образуют мультислойные слои достаточно плотной упаковки. Фосфолипидная фракция этого микроорганизма по своей структурной организации отличалась однородностью и стабильностью при хранении в течение 10 месяцев при 4°C. Напротив, липиды фосфолипидных фракций *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Nonomuraea* sp. INA 34-06 формировали ламеллярную и гексагональную (H_{II}) фазы. При этом их фа-

зовое состояние зависело от уровня гидратации и изменялось в процессе хранения. Полученная информация позволяет предположить, что выявленные различия в организации и стабильности мембранных структур исследованных актинобактерий могут служить показателем их устойчивости к повреждающим факторам консервации.

Цель нашего исследования — изучить выживаемость актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433^T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Nonomuraea* sp. INA 34-06 и сохранение ими антибиотической активности при хранении в условиях низких температур (–70°C).

Материал и методы

Объектами исследования явились два коллекционных штамма актинобактерий *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433^T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 продуцент противоопухолевого антибиотика карминомицина [17] и свежeweделенный из почвы штамм *Nonomuraea* sp. INA 34-06.

Антибиотическую активность изучаемых актинобактерий в отношении ряда тест-организмов определяли методом штриха [18].

Штаммы актинобактерий выращивали на овсяном агаре при температуре 28°C до спороношения [19]. Для отделения спор от мицелия производили смыв культуры стерильной дистиллированной водой со скошенной агаровой среды в пробирке. Полученную суспензию отфильтровывали через стерильный бумажный фильтр «Ф» ГОСТ 12026-76 («Химмед» РФ). Споры суспензии были использованы в следующих концентрациях: 10², 10⁵, 10⁶, 10⁷ КОЕ/мл. Концентрации спор 10⁵–10⁷ КОЕ/мл получали при смыве воздушного мицелия актиномицета, выросшего на одной пробирке со скошенной овсяной средой, 10 мл дистиллированной воды. Концентрации клеток 10² были получены разведением исходной суспензии.

Для повышения устойчивости клеток к воздействию низких температур, как известно, целесообразно применение защитных веществ. В качестве криопротектора применяли глицерин («Реахим», РФ) в концентрации 10%.

Для заморозки споровых суспензий использовали криопробирки («Greiner bio-one», Германия). Замораживание и хранение образцов проводилось в низкотемпературном морозильнике Revco («Thermo Scientific», США) при –70°C.

Процесс восстановления замороженных клеток осуществляли путём оттаивания при комнатной температуре.

Число жизнеспособных клеток определяли методом подсчёта КОЕ после посева проб на чашки Петри с агаровой средой 2 Гаузе [19]. Процент выживших КОЕ актинобактерий рассчитывали относительно числа КОЕ, подсчитанных до криоконсервации. Посев проб проводили каждый месяц в течение 1,5 лет.

Антибиотическую активность выросших после хранения КОЕ определяли путём засева чашек Петри с выросшими колониями актиномицетов двухсуточной культурой *Micrococcus luteus* ATCC 9341. После инкубации в течение суток при температуре 37°C подсчитывали количество колоний актинобактерий с зонами подавления роста тест-организма.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Проведённые исследования показали, что выживаемость споровых суспензий актинобактерий *S. hygroscopicus* RIA 1433^T, *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Nonomuraea* sp. INA 34-06 в

Таблица 1. Жизнеспособность исследуемых культур актинобактерий при хранении при температуре -70°C

Название штамма	Наличие криопротектора	Число жизнеспособных клеток		
		до заморозки	через 1 год	через 1,5 года
<i>Nonomuraea</i> sp. INA 34-06	нет	$56,8 \pm 4,65 \cdot 10^5$	$57 \pm 3,75 \cdot 10^5$	$56,6 \pm 3,46 \cdot 10^5$
	10% p-р глицерина	$58,3 \pm 4,25 \cdot 10^5$	$57 \pm 2,92 \cdot 10^5$	$58,4 \pm 6,6 \cdot 10^5$
<i>S.hygroscopicus</i> RIA 1433 ^T	нет	$20 \pm 1,31 \cdot 10^5$	$18,8 \pm 1,33 \cdot 10^5$	$19,8 \pm 2,1 \cdot 10^5$
	10% p-р глицерина	$18,4 \pm 1,83 \cdot 10^5$	$18,9 \pm 1,25 \cdot 10^5$	$18,9 \pm 1,57 \cdot 10^5$
<i>N.roseoviolacea</i> subsp. <i>carminata</i> INA 4281	нет	$23 \pm 1,05 \cdot 10^5$	$23,6 \pm 0,98 \cdot 10^5$	$23,2 \pm 1,05 \cdot 10^5$
	10% p-р глицерина	$18,6 \pm 0,84 \cdot 10^5$	$18,4 \pm 0,98 \cdot 10^5$	$18,6 \pm 0,83 \cdot 10^5$

Таблица 2. Антибиотическая активность актинобактерий *S.hygroscopicus* RIA 1433^T, *N.roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Nonomuraea* sp. INA 34-06 в отношении тест-организмов

Название тест-организма	Антибиотическая активность (диаметр зоны подавления роста, мм)		
	<i>S.hygroscopicus</i> RIA 1433 ^T	<i>N.roseoviolacea</i> subsp. <i>carminata</i> INA 4281	<i>Nonomuraea</i> sp. INA 34-06
<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00985 (209P)	> 25	10	10
<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	> 25	10	5
<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00762 (209P/УФ-2)	> 25	15	5
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	> 25	10	7
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6533	10	5	5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y1334	15	—	—

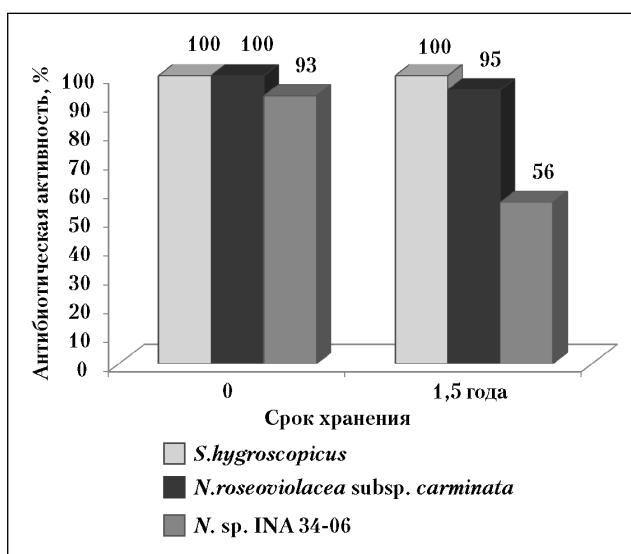
концентрации 10^5 КОЕ составляет 100% после 1,5 лет хранения при температуре -70°C . В опытах с использованием криопротектора — 10% раствора глицерина, и без него выживаемость актинобактерий была одинаковой (табл. 1).

Полученные результаты говорят о том, что данные актинобактерии в стадии спороношения обладают высокой устойчивостью к замораживанию и хранение споровых суспензий в течение одного года можно осуществлять без применения криопротектора. Отсутствие существенных различий при хранении актинобактерий с криопротектором и без него также было отмечено в работе Каменских с соавторами [2] при хранении при -85°C алканотрофных актинобактерий рода *Rhodococcus*.

Известно, что при хранении микроорганизмов коллекционных и промышленных штаммов, помимо потери жизнеспособности клеток, наблюдаются также процессы популяционной изменчивости. При этом доминантный фенотип замещается другим с измененными свойствами и продуктивной активностью, происходит потеря штаммами приоритетных свойств [6].

Изучаемые культуры актинобактерий обладают антибиотической активностью в отношении ряда тест-организмов (табл. 2).

На протяжении всего периода хранения проводился контроль антибиотической активности в отношении тест-организма *Micrococcus luteus*. В течение 1,5 лет полностью сохранил антибиотическую активность штамм *S.hygroscopicus*, небольшое снижение активности (5%) наблюдалось у *N.roseoviolacea* subsp. *carminata*, самая большая по-

**Рис. 1.** Антибиотическая активность актинобактерий *S.hygroscopicus* RIA 1433^T, *N.roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Nonomuraea* sp. INA 34-06 в отношении *Micrococcus luteus* до заморозки (0) и после 1,5 лет хранения при -70°C

теря активности (37%) была у *Nonomuraea* sp. INA 34-06 (рис. 1).

Следует отметить, что антибиотическая активность штамма *Nonomuraea* 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 низ-

ких температур (-70°C) является потеря антибиотической активности колониями штамма *Nonomuraea* sp. INA 34-06.

При замораживании споровых суспензий исследуемых культур в более высоких концентрациях (10^6 и 10^7) выживаемость в течение 1,5 лет составила 100% у каждого штамма, так же как и в опыте, где концентрация споровых суспензий составляла 10^5 КОЕ/мл. Стрептомицет полностью сохранил антибиотическую активность в отношении *Micrococcus luteus*; у штамма *N.roseoviolacea* subsp. *carminata* наблюдалась небольшая 3–4% потеря активности к концу периода хранения, у штамма *Nonomuraea* sp. INA 34-06 потеря активности составила 40–41% по сравнению с активностью до заморозки.

Для выяснения жизнеспособности клеток при их более низких концентрациях споровые суспензии были заморожены в концентрации 10^2 КОЕ/мл. Было также изучено влияние криопротектора на выживаемость штаммов. Полученные результаты показали, что даже при низких концентрациях споровых суспензий штамм *S.hygroscopicus* не только не утратил жизнеспособности, но и полностью сохранил антибиотическую активность в отношении *Micrococcus luteus* в течение 1,5 лет в отличие от культур рода *Nonomuraea*, которые полностью утратили жизнеспособность после 8 месяцев хранения (рис. 2, а и б).

Полученные результаты, по-видимому, можно объяснить тем, что при пониженном содержании клеток в суспензии значительно ослаблены межклеточные взаимодействия, снижен уровень защитных веществ, вырабатываемых клетками в ответ на стрессовые воздействия. При этом важнейшие клеточные структуры и, прежде всего, мембрана оказываются наиболее уязвимы к действию повреждающих факторов замораживания [20].

Как известно, сохранность клеточных мембран при низкотемпературном хранении микроорганизмов является определяющим фактором их жизнеспособности [21].

В условиях низких температур устойчивость мембранных структур во многом зависит от фазо-

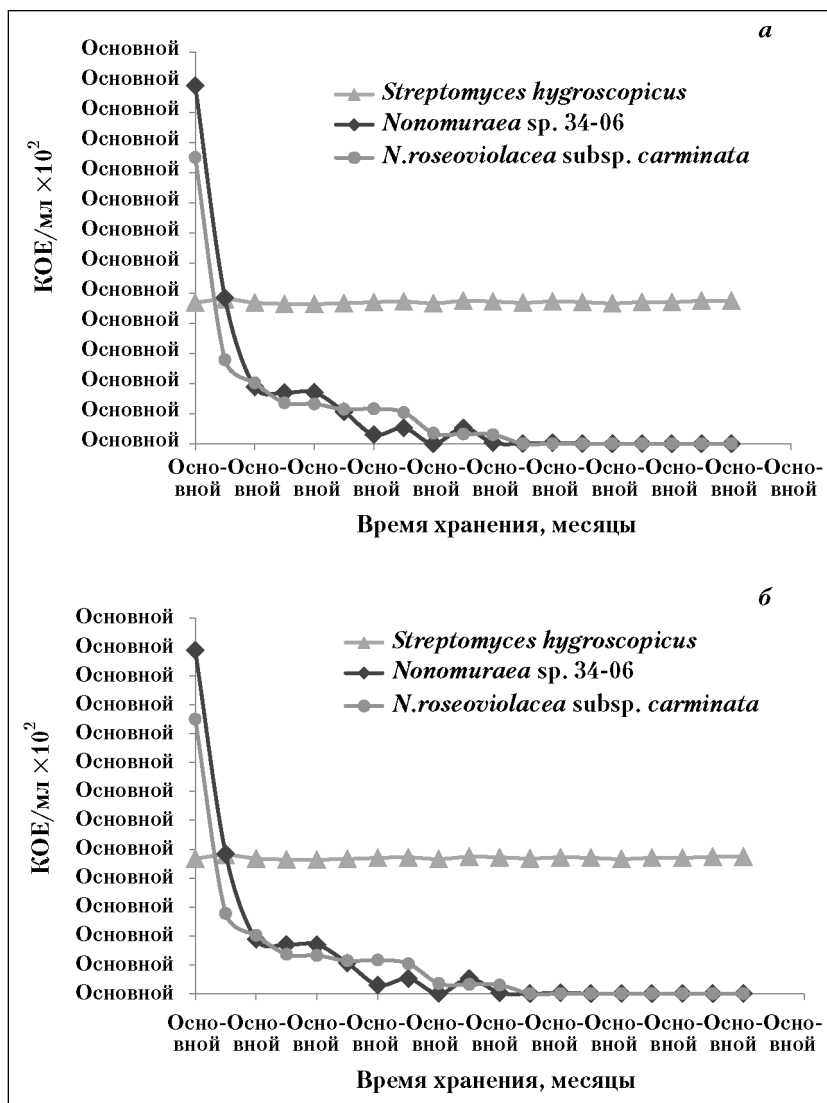


Рис. 2. Выживаемость актинобактерий *S.hygroscopicus* RIA 1433T, *N.roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Nonomuraea* sp. INA 34-06 в отношении *Micrococcus luteus* при хранении при температуре -70°C при низкой концентрации споровых суспензий. а – без использования криопротектора; б – с криопротектором.

вого состояния фосфолипидов, которое определяется конфигурацией структурообразующих компонентов, особенностями их организации и способности к фазовым переходам, не вызывающих последующей дезинтеграции бислоиности мембран. Полученная нами ранее [16] информация о фазово-структурной организации фосфолипидной составляющей клеточных мембран исследуемых актинобактерий свидетельствовала о стабильности ламеллярной конфигурации доминирующих фосфолипидов *S.hygroscopicus* RIA 1433T, что могло способствовать сохранению бислоиной упаковки клеточных мембран. Напротив, структурные флуктуации доминирующих мембранных фосфолипидов актинобактерий рода *Nonomuraea* являлись причиной нестабильности

их фазовых состояний, что, в свою очередь, могло привести к нарушению бислоиности мембраны. Результаты настоящего исследования показали, что штамм *S.hygroscopicus* RIA 1433^T оказался наиболее устойчив к условиям длительного хранения при низких температурах независимо от фактора концентрации клеточных суспензий. В то же время оба штамма актинобактерий рода *Nonomuraea* утратили жизнеспособность на более ранних этапах хранения при низких концентрациях клеточных суспензий, при которых клеточные структуры оказались наиболее чувствительны к повреждающему действию замораживания. Выявленные отличия в устойчивости исследованных актинобактерий к низкотемпературному хранению согласуются с выдвинутыми нами ранее предположениями о различной степени устойчивости клеточных мембран данных актинобактерий к повреждающему воздействию консервации.

Криопротектор (10% раствор глицерина) при замораживании спор актинобактерий в низких

концентрациях также не оказал влияния ни на жизнеспособность споровых суспензий, ни на сохранение антибиотической активности.

Заключение

Проведённое исследование показало, что споры актинобактерий *S.hygroscopicus* RIA 1433^T, *N.roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Nonomuraea* sp. INA 34-06 в концентрациях 10^5 – 10^7 КОЕ/мл полностью сохраняют жизнеспособность в течение 1,5 лет при хранении при температуре -70°C . Наиболее устойчивым к хранению оказался штамм *S.hygroscopicus* RIA 1433^T. Использование 10% раствора глицерина в качестве защитной среды не оказало влияния на хранение исследуемых актинобактерий. Полученные данные позволяют предположить, что споровые суспензии других родов и видов актинобактерий могут также храниться в низкотемпературных морозильниках без потери жизнеспособности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горин Е.Е., Хлебникова Г.М., Звягинцев Д.Г. Замораживание почвенных образцов в сухом льду как способ хранения для микробиологических исследований. Микробиология. 1978; 47: 1: 173–174.
2. Каменских Т.Н., Калашикова Е.А., Ившина И.Б. Особенности криоконсервации алканотрофных актинобактерий рода *Rhodococcus*. Вестник пермского университета. 2010; Вып. 1: 15–20.
3. Кузнецова В.И., Новотельнов Н.В. О длительном хранении микроорганизмов. Микробиология 1967; XXXVI: 6: 1100–1104.
4. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. 2009; 4: 99–120.
5. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Гальченко В.Ф. Многолетнее хранение коллекционных культур актинобактерий. Микробиология 2012; 81: 5: 682–690.
6. Цуцаева А.А., Ананьина А.Е., Бальбердина Л.М., Степанюк Л.В., Павленко Н.В. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов. Микробиология 2008; 77: 5: 696–700.
7. Ryan M.J., Smith D. Cryopreservation and freeze-drying of fungi employing centrifugal and shelf freeze-drying. Cryopreservation and freeze-drying protocols. In: Methods in Molecular Biology. V. 368 / Eds. Day J.G. and Stacey G.N. Totowa. NJ.:Humana Press Inc. 2007. P. 127–140.
8. Чукпарова А.У. Оценка сохранения жизнеспособности штаммов микроорганизмов при низкотемпературной консервации / Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов — прошлое, настоящее, будущее». К 90-летию заслуженного профессора Московского университета Н.С.Егорова. М.: 2011; 131.
9. Витанов Т., Петухов В.Г. Действие низких температур и защитный эффект поливинилпирролидона различного молекулярного веса. Микробиология 1973; XLII: 4: 647–649.
10. Волков В.Я. К вопросу о физиологических и физико-химических механизмах стабильности микроорганизмов к замораживанию и высушиванию. Микробиология. 1994; 63: Вып. 1: 5–16.
11. Лозина-Лозинский Л.К. Очерки по криобиологии. Адаптация и устойчивость организмов и клеток к низким и сверхнизким температурам. Л.: Наука. 1972; 288.
12. Иваницкая Л.П., Новикова Н.Д., Сингал Э.М., Бибикова М.В. IV Международная конференция по коллекциям культур микроорганизмов. Антибиотики 1982; 27: 2: 151–154.
13. Dubko T., Onishenko E.V., Pivovarenko V.G. Influence of freezing and low molecular weight cryoprotectants on microsomal membrane structure: a study by multiparametric fluorescent probe. J Fluoresc 2006; 16: 817–823.
14. Белякова Л.А., Надирова И.М., Фатеева М.В. I Международная конференция по коллекциям культур. Микробиология 1970; 39: 1: 179–182.
15. Williams W.P. Cold-induced lipid phase transitions. Phil Trans R Soc Lond 1990; 326: 555–570.
16. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Ермакова Е.В., Киселев М.А., Терехова Л.П., Синева 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; 82: 3: 335–343.
17. Гаузе Г.Ф., Свешикова М.А., Ухолина Р.С., Гаврилина Г.В., Филичева В.А., Гладких Е.Г. Образование противоопухолевого антибиотика карминомицина культурой *Actinotadura carminata* sp. nov. Антибиотики 1973; 18: 8: 675–678.
18. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука. 2004; 528.
19. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешикова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука. 1983; 245.
20. Николаев Ю.А. Два новых клеточных адаптогенных фактора *Escherichia coli* K12. Микробиология 1997; 66: 6: 785–789.
21. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Молекулярные механизмы криоповреждения мембранных структур. Криобиол криомед 1979; 5: 3–13.