

57
А-71



Биологический факультет

на правах рукописи

НГУЕН ТХАНЬ ДАТ

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПРИ ПОИСКАХ АКТИНОМИЦЕТОВ-
ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ.

Микробиология - 03.00.07.

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ИЗДАТЕЛЬСТВО МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА • 1973

Работа выполнена в лаборатории антибиотиков биологического факультета МГУ.

Научные руководители: доктор химических наук, профессор

А.Б.СИЛАЕВ

кандидат биологических наук

К.А.ВИНОГРАДОВА

кандидат химических наук

В.А.ПОЛТОРАК

Официальные оппоненты: доктор биологических наук

Д.Г.ЗВЯГИНЦЕВ

кандидат биологических наук

Л.И.ПЕТРОВА

Ведущее учреждение: Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков
Министерства медицинской промышленности.

Автореферат разослан ноября 1973 г.

Защита диссертации состоится декабря 1973г. в 15 час. на заседании Секционного Совета по ботанике физиолого-биохимического отделения биологического факультета Московского государственного университета (Москва, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке факультета.

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ СОВЕТА

/Л.Ф.НИКОЛАЕВА/

576.8

А71

ВВЕДЕНИЕ

При изыскании актиномицетов-продуцентов антибиотиков большое внимание уделяется приёмам быстрой идентификации синтезируемых ими антибиотических веществ на ранних этапах изучения. Одним из перспективных направлений в этом отношении является применение методов люминесцентного анализа.

Способность к яркой собственной люминесценции в видимой области спектра при фотовозбуждении широко распространена среди актиномицетов и, как указывалось, может служить одним из критериев при их дифференциации и идентификации /Звягинцев и др., 1964; Морозов, 1964; Виноградова, 1966/. Это биологическое свойство представляет большой интерес также и с точки зрения возможности его использования при идентификации актиномицетов-продуцентов антибиотиков определенного типа строения уже на ранних стадиях выделения их из природных субстратов.

Значительное число антибиотических веществ, продуцируемых актиномицетами, люминесцирует при фотовозбуждении УФ-светом/Блинов, Хохлов, 1970; Полторак, 1972/. Для некоторых продуцентов было показано, что специфическая собственная люминесценция их культур связана с присутствием люминесцирующего антибиотика/Рудая, 1958; Виноградова, Полторак, 1966; Морозов, Барашкова, 1967; Красильников и др., 1971/.

Имеющийся в литературе комплекс работ по изучению собственной люминесценции актиномицетов наметил перспективы широкого использования этого явления для различных целей: при идентификации видов актиномицетов, при поиске продуцентов антибиотиков определенного типа строения, при направленной

1-2272



селекции активных продуцентов, при изучении локализации антибиотиков в культурах актиномицетов-продуцентов и в ряде других случаев.

В связи с вышеизложенным в задачу настоящего исследования входило исследование возможностей использования люминесцентного анализа для поисков актиномицетов-продуцентов антибиотиков, а именно:

1. Выделение из почвенных образцов актиномицетов-продуцентов, обладающих способностью к яркой специфической люминесценции при возбуждении УФ-светом. Основное внимание при этом было уделено актиномицетам из группы *Chromogenes*, среди которых описано большое число продуцентов разнообразных антибиотиков /Красильников, 1970/;

2. Идентификация синтезируемых ими антибиотических веществ;

3. Изучение биологических свойств выделенных актиномицетов и идентификация их с известными в литературе видами.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы состоит из двух глав. В первой главе приведены данные о собственной люминесценции актиномицетов и использовании этого свойства при исследовании антибиотиков и их продуцентов.

Во второй главе рассмотрены история вопроса и современные представления о составе, строении, биологическом действии и физико-химических свойствах антибиотиков группы ауреоловой кислоты.

Группа ауреоловой кислоты объединяет ряд антибиотиков-гликозидов. В нее входят: ауреоловая кислота, хромомицины,

оливомицины и вариамицины. Агликоны антибиотиков группы ауреоловой кислоты представлены двумя типами: оливин и хромомицинон, которые отличаются друг от друга группой CH_3 (хромомицин является метилоливином). Оливомицины являются производными оливина, ауреоловая кислота, хромомицины и вариамицины-производные хромомицинона. Кроме агликона, каждый антибиотик содержит 4 сахара из возможных шести: D-оливомикоза, D-оливомиоза, D-оливоза, D-олиоза, D-микароза и D-вариоза.

Во второй главе представлены также данные о таксономическом положении актиномицетов-продуцентов антибиотиков группы ауреоловой кислоты и их изменчивости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования служили выделенные из почвенных образцов штаммы актиномицетов из группы *Chromogenes*, обладающие характерной собственной люминесценцией при фото-возбуждении.

Коллекция штаммов актиномицетов была создана при микробиологическом анализе 172 образцов различных почв. Образцы были взяты по растительным зонам. Кроме почв естественных растительных ассоциаций, были проанализированы некоторые окультуренные почвы.

Для выделения из почвы и количественного учета актиномицетов применялась известная методика посева почвенных образцов из водной почвенной суспензии с предварительным растиранием навески почвы для десорбции микроорганизмов с почвенных частиц /Звягинцев, 1969/. Высев производился на агаризованную среду Чапека (с глюкозой) как одну из благоприят-

ных для первого наблюдения собственной люминесценции культур непосредственно при их выделении. Всего было выделено 212 штаммов актиномицетов из группы *chromogenes* и около 500 иных, среди которых по характерной собственной люминесценции было отобрано для дальнейшего изучения около 50 культур.

Изучение биологических свойств исследуемых актиномицетов в целях установления их таксономического положения проводилось в соответствии с разработанными методами и на средах, описанных в известных руководствах /Гаузе и др., 1957; Сборники "Биология отдельных групп актиномицетов", 1960, 1965; Waksman, 1961; Shirling, Gottlieb, 1966, 1968, 1969; Красильников, 1970/. Для объективизации описания окраски культур применялись шкалы цветов /Бондарцев, 1954; Tresner, Backus, 1965/.

В работе были использованы типовые культуры *Actinomyces globisporus* var. *flavofuscus* II296-61 ИНА, *Act. abolicaseus* II294-62 ИНА, *Act. nigrificans* 3014 ИНА, *Act. abiraviensis* 732, 893, II07 ВНИИА.

При электронномикроскопическом исследовании рельефа поверхности споровой оболочки, кроме обычного метода отпечатков на коллодиевой пленке, был использован модифицированный метод углеродных реплик: споры хорошо спорулирующей культуры продуцента, выращенного на среде Чапека (с глюкозой) в течение 10-14 дней, нанесенные на коллодиевую подложку, помещали под вакуумный колокол и напыляли на них под углом тонкий слой платины, после чего покрывали слоем углерода. После извлечения из-под вакуума проводили травление препаратов 40% хромовой кислотой в течение одного-полутора часов, промывали дистиллированной водой, обрабатывали 20 %

NaOH в течение 10-15 минут, а затем несколько раз промывали препараты водой. Изучение вели в электронном микроскопе УЭМ-100; инструментальное увеличение 16.000-35.000.

Стереоскопические изображения спор, оттененных золотом, были получены на сканирующем микроскопе "НСМ-2А".

В специальных целях было проведено изучение поверхности споровой оболочки штамма I44-3: культура выращивалась в течение 14 дней при 28°C на основной среде Чапека (с глюкозой), куда вносились различные источники азота из расчета 32 мг%. В качестве источников азота были использованы: NaNO_3 , $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , фецилаланин, лизин, глутаминовая кислота, мочевины, норлейцин, DL-лейцин, валин, пролин, DL-цистин, треонин, триптофан, DL-метионин, аспарагиновая кислота, β -аланин.

С целью определения ферментативной активности изучаемых актиномицетов, а также усвоения ими источников углерода использовали общепринятые стандартные тесты и среды, описанные в сборнике "Биология отдельных групп актиномицетов", 1960, а также рекомендации Международного опыта по переопределению типовых штаммов актиномицетов и установлению видовых эталонов (I.S.P.) / Shirling, Gottlieb, 1966/.

Изучение антимикробного спектра действия исследуемых продуцентов проведено с применением широкого набора разнообразных тест-организмов (около 60 культур). Люминесцентные свойства выделенных актиномицетов определялись по описанной методике /Звягинцев и др., 1964/. Для более полного учета продуцентов, способных синтезировать люминесцирующие вещества, просматривалась также люминесценция экстрактов культур/Мо-

розов, 1964/.

Биосинтез антибиотических веществ проводили при культивировании продуцентов в погруженных условиях на среде с соевой мукой / Warren et al., 1955/. Количество продуцируемого хромомидина определяли спектрофотометрически на спектрофотометре СФ-4. Для определения активности культур применялся и обычный метод серийных разведений с использованием соответствующих тест-организмов.

При изучении изменчивости продуцентов хромомидина был использован метод рассева моноспоровой суспензии / Кузнецов, 1972/..

Для оценки вариабельности культур-продуцентов хромомидина по признаку антибиотикообразования значения антибиотической активности подвергали математической обработке / Плехинский, 1970; Дмитриев, 1972/.

Люминесцирующие антибиотики выделяли путем экстракции этилацетатом или н-бутанолом культур, выращенных на агаризованных средах или при глубинном культивировании. Компонентный состав выделенных антибиотиков изучали методом хроматографии на бумаге в ряде систем растворителей. При идентификации антибиотиков группы ауреоловой кислоты использовали также хроматографию в тонком слое кремневой кислоты. Хроматограммы просматривали в УФ-свете и проявляли на газонах, засеянных тест-микробами. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре СФ-4, спектры люминесценции - на спектрофлуориметре Ivon and Tobin. При идентификации антибиотика I44-3 в качестве свидетелей использовали препараты оливомицина (фармацевтический препарат), митрамицина и хромо-

мицина, образуемого *Act. nigrificans* штамм 3014. Разделение на компоненты антибиотика I44-3 проводили в 2 этапа: путем распределительной хроматографии на колонке с целлюлозой в хлороформе отделяли первый компонент от второго и третьего, затем в системе ацетон-эфир-гексан (18:7:25) разделяли второй и третий компоненты.

Гидролиз антибиотика I44-3 и оливомицина проводили по известной методике / Бражникова и др., 1964; Берлин и др., 1964; Жданович и др., 1971/. При идентификации сахаров антибиотика I44-3 в качестве свидетелей использовали сахара, полученные при гидролизе оливомицина.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИЗЫСКАНИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ-ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ.

С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

В результате микробиологической обработки 172 почвенных образцов выделено свыше 200 хромогенных актиномицетов, у которых были изучены антагонистические и люминесцентные свойства. При этом среди продуцентов с выраженным действием по отношению к грамположительным микроорганизмам были отмечены культуры, обладающие специфической собственной желтой люминесценцией при фотовозбуждении, а также культуры со специфической оранжевой люминесценцией. Результаты изучения культур с желтой люминесценцией, а также синтезируемых ими люминесцирующих веществ представлены в последующих разделах данной работы.

Культуры продуцентов с оранжевым свечением по специфич-

ческой люминесценции и характерному антимикробному спектру действия отнесены к группе продуцентов антибиотиков типа гелиомицина.

При использовании люминесцентного анализа для поисков продуцентов антибиотиков надо учитывать, что не всегда люминесценция антибиотика обнаруживается в культуре его продуцента. Это может быть вызвано разными причинами: тушением люминесценции антибиотика, обусловленным особым его физико-химическим состоянием в культуре, присутствием других веществ, более яркое свечение которых "перекрывает" свечение искомого антибиотика, очень малым его количеством и др. Ввиду этого для более полного учета штаммов, продуцирующих люминесцирующие вещества, необходимо просматривать не только люминесценцию агаровых культур, но и свечение их экстрактов при фотовозбуждении / Морозов, 1964/.

Среди выделенных культур актиномицетов было отмечено 10 штаммов, обнаруживающих значительную активность по отношению к мицелиальным грибам и дрожжам. Собственная люминесценция их агаровых культур была неспецифичной (за исключением двух штаммов), тогда как просмотр под УФ-светом экстрактов агаровых культур в этилацетате и н-бутаноле показал, что восемь штаммов из десяти продуцируют люминесцирующие вещества. Таким образом, рассмотрение свечения экстрактов культур существенно дополняет наблюдения картины их собственной люминесценции при обнаружении продуцентов люминесцирующих веществ.

Штаммы-продуценты антигрибных антибиотиков были идентифицированы с известными в литературе видами (*Act. tsusima-*

ensis, *Act. diastatochromogenes*, *Act. fumovadus*, *Act. reticuloseus* и *Act. robustus*), а антибиотические вещества, продуцируемые двумя из указанных видов, по характерному УФ-спектру поглощения отнесены к пентаенам.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ.

Штамм I44-3 был отобран в качестве объекта исследования вследствие наличия у него специфической собственной люминесценции желтого цвета. Путем экстракции этилацетатом из культуры штамма I44-3 было выделено вещество, обладающее люминесцентными свойствами и антибиотической активностью. Антибиотик I44-3 имел спектр поглощения с максимумами при 226, 282, 315 и 416 нм (в метаноле), что позволило отнести его к антибиотикам группы ауреоловой кислоты.

Для дальнейшей идентификации антибиотика I44-3 и его сравнении с другими представителями группы ауреоловой кислоты использовали метод хроматографии на бумаге в различных системах растворителей. При хроматографировании в системе н-бутанол-дихлорэтан-формамид-вода (5:45:16:34) наблюдалось разделение препарата I44-3 на три компонента с R_f соответственно 0,25; 0,52 и 0,67. Количественное соотношение компонентов 1, 2 и 3 составляло 2:3:3. При хроматографии на бумаге в различных системах растворителей с оливомицином и хромомицином в качестве свидетелей было установлено, что антибиотик I44-3 идентичен по значениям R_f хромомицину и отличается от оливомицина в трех системах растворителей.

При хроматографии в тонком слое кремневой кислоты анти-

биотик I44-3 имел значения R_f одинаковые с хромомицином и отличался от оливомицина.

Для характеристики компонентов антибиотика I44-3 определяли спектры поглощения, величины коэффициентов поглощения, удельное вращение и антимикробный спектр действия. Отдельные компоненты антибиотика I44-3 имели следующие характеристики спектров поглощения в метаноле:

Компонент 1. $\lambda_{\max}, \text{нм}, (E_1)_{\text{см}}^{1\%}$: 230, 275, 315, 416 (228, 260, 93, 27)

Компонент 2. $\lambda_{\max}, \text{нм}, (E_1)_{\text{см}}^{1\%}$: 228, 282, 315, 416, (144, 300, 55, 71)

Компонент 3. $\lambda_{\max}, \text{нм}, (E_1)_{\text{см}}^{1\%}$: 226, 282, 315, 416, (180, 256, 66, 48)

Значения удельного вращения $[\alpha]_D^{20}$ для трех компонентов в метаноле равны соответственно: -22,2; -6,4 и -36,5.

Для идентификации антибиотика I44-3 исследовали продукты кислотного гидролиза. Проводили сравнительное хроматографическое исследование агликона антибиотика I44-3 с оливином и хромомицином. Было установлено, что агликон антибиотика I44-3 имеет одинаковые значения R_f при хроматографии на бумаге, что и хромомицион, и отличается от оливина. Спектры поглощения агликона антибиотика I44-3 и хромомицинона также идентичны. Полученные данные позволяют сделать вывод, что агликон антибиотика I44-3 является хромомицином.

Изучение компонентного состава сахаров в продуктах гидролиза антибиотика I44-3 методом хроматографии на бумаге показало, что в продуктах гидролиза антибиотика I44-3 обнаруживаются те же 5 сахаров, что и в продуктах гидролиза оливомицина.

Полученные данные позволяют сделать вывод об идентич-

ности антибиотика I44-3 хромомицину.

Особое внимание уделялось изучению люминесцентных свойств антибиотика I44-3. Были определены спектры люминесценции антибиотика I44-3, хромомицина и оливомицина в метаноле, 0,1M HCl в метаноле и 0,1M NaOH в метаноле. Было установлено, что оливомицин и хромомицин отличаются по интенсивности люминесценции, по положению максимума спектра люминесценции и по зависимости ее от pH раствора.

Кроме штамма I44-3 в качестве объектов исследования было отобрано еще семь штаммов, имеющих аналогичную специфическую люминесценцию желтого цвета. Результаты исследования люминесцирующих веществ этой группы штаммов показали, что их люминесценция обусловлена хромомицином.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ИЗУЧАЕМЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ХРОМОМИЦИНА.

В данном разделе работы приведены результаты изучения биологических свойств и таксономического положения выделенных продуцентов хромомицина.

У штамма I44-3 -продуцента хромомицина были изучены значимые с точки зрения таксономии свойства: строение споросцев, рельеф поверхности споровой оболочки, культуральные признаки, способность расти на различных источниках углерода, а также антагонистические и люминесцентные свойства. При сравнении с известными в литературе видами, после рассмотрения близости с описанными ранее продуцентами антибиотиков группы ауреоловой кислоты, дополненного непосредственным параллельным изучением имеющихся в нашем распоряжении

типовых культур, штамм I44-3 был отнесен к новой разновидности *Act. aburaviensis* var. *verrucosus* var. nov. . Для изучаемого продуцента хромомидина I44-3 характерно формирование спор с бугристой поверхностью оболочки в отличие от типовой культуры *Act. aburaviensis* , формирующей гладкие споры. Есть отличия и в усвоении источников углерода.

Известно, что актиномицеты очень переменчивы и обладают широким диапазоном полиморфизма, что необходимо учитывать при их дифференциации и идентификации. Отсутствие знаний о диапазоне изменчивости культуры продуцента может привести к неправильному определению её таксономического положения. С другой стороны, изучение изменчивости такого практически важного признака как антибиотикообразование служит теоретическим основанием для проведения селекционной работы по получению активных культур.

В связи с вышесказанным, в данной работе применительно к изучаемым культурам были выбраны следующие вопросы: изучение изменчивости тех биологических свойств, которые используются при идентификации актиномицетов, выявление и изучение стабильных вариантов исследуемых культур в связи с таксономией, а также с возможностью получения более продуктивных форм.

Рельеф поверхности споровой оболочки относится к категории традиционно используемых в таксономии морфологических признаков и в ряду других таксономических показателей рассматривается как наиболее весомый и стабильный /Красильников, 1960; Shirling, Gottlieb, 1966/. В литературе имеются не-многие сведения о изменчивости этого свойства /Лешевалье,

Тихоненко, 1960; Мордарский, Кудрина, 1961; Hodgkiss, Mitchell, 1965/. В связи с особым значением рельефа поверхности оболочки спор для выделения новой разновидности была изучена изменчивость этого свойства у штамма I44-3. Из экспериментальных данных следует, что рельеф поверхности оболочки спор, а также их форма подвержены значительной изменчивости в зависимости от состава среды культивирования, и, в частности, от источника азота в среде. Формирование спор с бугристой поверхностью наиболее интенсивно происходит, когда в основной среде в качестве единственного источника азота присутствует нитрат натрия или аланин, и, в меньшей степени, - нитрат аммония, мочевины, лизин или пролин. Глютаминовая и аспарагиновая кислоты, а также комплексные органические среды, не благоприятны для выявления бугристости оболочки спор.

В литературе указывалось, что образование характерных выростов на поверхности оболочки спор коррелирует с интенсивным развитием воздушного мицелия и обильным спорообразованием /Лешевалье, Тихоненко, 1960/. У культуры I44-3 условия формирования спор с бугристой оболочкой не совпадают с условиями, благоприятствующими интенсивному спорообразованию.

Если соотношение бугристых и гладких спор, формируемых культурой, сильно варьирует в зависимости от состава среды, то характер образующихся выростов на поверхности споровой оболочки принципиально не меняется. Таким образом, состав среды сильно влияет на само формирование характерных выростов оболочки - вплоть до полного их отсутствия в некоторых условиях.

Полученные данные отражают фенотипическую изменчивость

изучаемого продуцента хромомидина и указывают на то, что для выявления характерного рельефа поверхности оболочки спор, по крайней мере в некоторых случаях, требуется подбор специальных условий.

Одним из проявлений изменчивости актиномицетов является наличие в их культурах стабильных вариантов, что было описано для различных видов /Кузнецов, 1973/. Нами было проведено исследование по обнаружению и сравнительному изучению биологических свойств вариантов изучаемых культур-продуцентов хромомидина.

Для культуры I44-3 (как и для других выделенных из почвы продуцентов хромомидина) характерна мозаичность окраски: формируемый воздушный мицелий серого или желтого цвета, а субстратный - желто-оливкового или черного. Методом моноспорового посева было показано, что исследуемая культура I44-3 полиморфна.

В моноспоровых посевах на специально подобранных средах было отмечено наличие нескольких типов колоний, различающихся по внешнему виду, из которых в преимущественном большинстве находились два. В литературе, посвященной изменчивости актиномицетов, такие формы принято называть "морфологическими вариантами". Внешним проявлением одновременного существования различных вариантов в культуре I44-3 и является гетерогенность её окраски.

В ряде последовательных пересевов выделенные варианты оставались относительно стабильными и взаимно выплели друг друга.

При сравнении вариантов по ряду значимых таксономичес-

ких свойств, было показано, что они не отличаются от исходной культуры по строению споросцев, по рельефу поверхности оболочки и форме спор, по тем физиолого-биохимическим свойствам, которые отмечаются при описании актиномицетов, а также по спектру антимикробного действия и синтезируемому антибиотику.

Выделенные "морфологические" варианты, различающиеся макроморфологией колоний и окраской, имеют ряд отличий в метаболизме: в способности усваивать источники углерода, в компонентном составе продуцируемых люминесцирующих веществ, а также по количественному признаку антибиотикообразования.

Исходная культура I44-3, кроме хромомидина, продуцирует вещество с фиолетовой люминесценцией, отличающееся по цвету люминесценции, хроматографической характеристике и УФ-спектру поглощения от хромомидина и не обнаруживающее антибиотической активности по отношению к различным микроорганизмам (испытано около 60 тест-культур). Было показано, что вещество с фиолетовой люминесценцией продуцируется, в основном, вариантом I, тогда как в культуре варианта 2 оно не определяется примененными методами. Варианты различаются и по способности синтезировать хромомидин: культура варианта 2 активно образует этот антибиотик практически на всех использованных средах, тогда как способность синтезировать хромомидин у варианта I резко ограничена и проявляется преимущественно на комплексных органических средах. При изучении биосинтеза хромомидина вариантом I на средах разного состава было показано, что между синтезом хромомидина и вещества

с фиолетовой люминесценцией существует обратная коррелятивная зависимость. Например, на среде Чапека (с глюкозой) хромомидин почти не синтезируется, тогда как вещество с фиолетовой люминесценцией интенсивно продуцируется, а на среде с соевой мукой, на которой наблюдается наилучшее образование хромомидина вариантом I, вещество с фиолетовой люминесценцией обнаруживается лишь в виде следов.

У выделенных вариантов были определены границы изменчивости по количественному признаку антибиотикообразования, при этом было обращено внимание на возможность получения более активных форм, поскольку выделенная из почвы исходная культура продуцента хромомидина обладала относительно низкой активностью (около 120 μ /мл).

Распределение значений антибиотической активности у обоих вариантов подчиняется закону нормального распределения и определяется границами $\bar{X} \pm 1,5 \sigma$ при $P=0,90$. Наибольший размах изменчивости по антибиотической активности наблюдается у варианта 2 ($\sigma = III$). Среднее арифметическое значение антибиотической активности варианта 2 почти втрое превышает таковое у варианта I, что математически достоверно. Самые активные формы, синтезирующие до 440 μ /мл хромомидина (что превышает активность исходной культуры в 3,7раза), выявляются среди колоний варианта 2. Для варианта I характерен сравнительно узкий размах изменчивости по количественному признаку антибиотикообразования. Максимальная активность, отмеченная для этого варианта, не превышает активности исходной культуры.

Корреляция морфолого-культуральных свойств колоний с их

антибиотической активностью позволяет отбирать высоко-активные продуценты хромомидина по внешнему виду.

Одним из наиболее четких внешних отличий вариантов являются различия в окраске воздушного и субстратного мицелия, а также в способности продуцировать растворимый пигмент. Была изучена изменчивость вариантов по культуральным и люминесцентным свойствам в зависимости от состава среды культивирования. При этом выявилось всё возможное в опытных условиях разнообразие фенотипов обоих вариантов, в целом составившее их диапазон реакции. Для варианта I характерна резкая разница между его фенотипами при росте на простых синтетических и комплексных органических средах. Например, на среде Чапека вариант I выглядит следующим образом: субстратный мицелий черный, воздушный -серый, среда не окрашена, тогда как на среде с дрожжевым экстрактом и сусликом он имеет иную окраску: субстратный мицелий - светло-оливковый, воздушный мицелий - светло-желтый, среда желтоватая. Фенотипы варианта 2, при росте его на средах разного состава не столь резко отличаются друг от друга, и диапазон реакции этого варианта свойственен широкий непрерывный ряд варьирования желтой окраски, при этом у варианта 2 не выявляется фенотип, сходный с вышеописанным фенотипом варианта I на среде Чапека.

Диапазоны реакций вариантов частично перекрываются, что выражается в сходстве фенотипов варианта 2 с фенотипами варианта I при культивировании последнего на комплексных органических средах. Перекрывание диапазонов реакции является одним из указаний на близость геномов выделенных вариантов.



Такое же частичное перекрывание диапазонов реакции вариантов отмечено и при изучении изменчивости их собственной люминесценции при фотовозбуждении. Было показано, что желтая окраска культуры (как и её характерная собственная люминесценция) связана с наличием хромомидина, а изменчивость

культуральных и люминесцентных свойств вариантов вызвана изменениями в биосинтезе хромомидина при разных условиях культивирования. Ограниченная способность варианта I синтезировать хромомидин обуславливает резкое различие его фенотипов на разных средах (равно как и наблюдаемые различия в собственной люминесценции). С другой стороны, заметное образование хромомидина вариантом I на комплексных органических средах приводит к появлению отмеченного выше сходства его фенотипов с фенотипами варианта 2 в этих условиях. Разнообразие фенотипов выделенных стабильных вариантов лежит в пределах фенотипической изменчивости исходной культуры и в совокупности даёт представление о внутривидовой изменчивости *Act. aburaviensis* var. *verrucosus* var. nov.

Кроме штамма-продуцента I44-3, из коллекции выделенных актиномицетов по характерной собственной люминесценции и по близкому спектру антимикробного действия было отобрано ещё семь культур, также продуцирующих хромомидин. Штаммы были выделены из разных почвенных образцов и имели определённые различия по характеру роста и воздушного мицелия, по окраске субстратного мицелия, а также по способности продуцировать растворимый пигмент. В то же время по ряду значимых таксономических показателей: строению спораносцев, рельефу поверхности споровой оболочки, меланиногенности, усвое-

нию источников углерода, а также по антагонистическим свойствам и синтезируемому антибиотику, все исследованные штаммы сходны с культурой I44-3. Ввиду этого для решения вопроса о таксономическом положении изучаемых продуцентов хромомидина было привлечено изучение их фенотипической изменчивости, а так же выявление и изучение "морфологических" вариантов.

Сравнение диапазонов реакции штаммов-продуцентов по культуральным и люминесцентным свойствам показало, что они частично перекрываются подобно тому, как перекрываются диапазоны реакции стабильных "морфологических" вариантов, обнаруженных в культуре I44-3. При посевах споровых суспензий изучаемых продуцентов хромомидина были выявлены "морфологические" варианты, сходные с теми, которые были обнаружены в культуре I44-3. Таким образом, изучение изменчивости дало дополнительные данные о близости всех исследуемых штаммов-продуцентов хромомидина, которые, следовательно, можно отнести к *Act. aburaviensis* var. *verrucosus*.

ВЫВОДЫ

1. В результате обработки 172 почвенных образцов выделено свыше 200 хромогенных актиномицетов. Проверены их антагонистические и люминесцентные свойства.

2. С использованием метода люминесцентного анализа были отобраны три группы штаммов-продуцентов:

- 1) со специфической собственной желтой люминесценцией агаровых культур при фотовозбуждении,
- 2) со специфической собственной оранжевой люминес-

ценцией

3) а также штаммы, обнаружившие образование люминесцирующих веществ при просмотре под УФ-светом экстрактов агаровых культур.

3. Исследование природы люминесцирующих веществ группы штаммов с желтой собственной люминесценцией показало, что последняя обусловлена образованием антибиотика хромомидина. Штаммы с собственной оранжевой люминесценцией агаровых культур по специфической люминесценции и характерному спектру действия отнесены к группе продуцентов антибиотиков типа гелиомицина. Штаммы-продуценты с антигрибной активностью образуют люминесцирующие соединения, два из которых отнесены к пентаеновым макролидным антибиотикам.

4. Отбор продуцентов хромомидина и антибиотиков типа гелиомицина можно вести по специфической собственной люминесценции их агаровых культур. Для более полного учета штаммов, продуцирующих люминесцирующие антибиотические вещества, необходимо просматривать не только люминесценцию агаровых культур, но и свечение их экстрактов при фотовозбуждении.

5. Описана новая разновидность продуцента хромомидина

Act. aburaviensis var. *verrucosus* var. nov.

6. Изучение изменчивости выделенных продуцентов хромомидина показало, что эти культуры полиморфны. Выявленные стабильные "морфологические" варианты различаются макроморфологией колоний, культуральными и люминесцентными свойствами, способностью усваивать источники углерода, компонентным составом люминесцирующих веществ и по количественному

признаку антибиотикообразования.

7. При изучении изменчивости по количественному признаку антибиотикообразования получены продуценты хромомидина, активность которых почти в 4 раза выше активности исходной культуры.

8. Показано, что размах изменчивости изучаемых продуцентов хромомидина по окраске и люминесцентным свойствам обусловлен изменениями в биосинтезе хромомидина.

9. Показано, что такой традиционно используемый в таксономии актиноциетов морфологический признак как строение поверхности оболочки спор подвержен значительной фенотипической изменчивости. Подобраны условия для выявления характерного рельефа поверхности споровой оболочки у изучаемого продуцента хромомидина.

СПИСОК

работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Полторак В.А., Нгуен Тхань Дат, Силаев А.Б.
Использование люминесцентного анализа при изыскании продуцентов антибиотиков, близких оливомицину. Антибиотики, 1972, т. 17, № 10, стр. 882.
2. Виноградова К.А., Нгуен Тхань Дат, Силаев А.Б.
Новый продуцент хромомицина *Actinomyces aviravienis* var. *verrucosus* var. nov.
Доклады высшей школы, биологические науки (в печати)
3. Виноградова К.А., Нгуен Тхань Дат, Силаев А.Б.
Внутривидовая изменчивость *Act. aviravienis* var. *verrucosus*. Доклады высшей школы, биологические науки (в печати).
4. Нгуен Тхань Дат, Полторак В.А., Силаев А.Б.
Использование люминесцентного анализа при поиске актиномицетов-продуцентов антибиотиков.
Доклады высшей школы, биологические науки (в печати).
5. Виноградова К.А., Васильева Л.С., Нгуен Тхань Дат, Силаев А.Б.
Полиморфизм культуры продуцента *Actinomyces aviravienis* var. *verrucosus* Антибиотики (в печати).
6. Нгуен Тхань Дат, Виноградова К.А., Дуда В.И.
Изменчивость рельефа споровой оболочки продуцента хромомицина *Act. aviravienis* var. *verrucosus*.
Микробиология (в печати).

ПОП. К ПЕЧАТИ 12/Х1-73 Г. ФОРМАТ 60x80/16
ФИЗ.П.Л. 1,5. УЧ.-ИЗД.Л. 1,0. ЗАКАЗ 2272. ТИР. 200

ОТПЕЧАТАНО НА РОТАПРИНТАХ В ТИП. ИЗД. МГУ
МОСКВА, ЛЕНГОРЫ