

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПО  
ИЗЫСКАНИЮ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ ИМЕНИ Г.Ф.ГАУЗЕ»

На правах рукописи

Синёва Ольга Николаевна

ПОЧВЕННЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ РЕДКИХ РОДОВ: ВЫДЕЛЕНИЕ,  
АНТИБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ ХРАНЕНИЕ

Специальность 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
Доктор биологических наук,  
заслуженный деятель науки РФ,  
профессор Терехова Л.П.

Москва, 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1. Селективное выделение актиномицетов редких родов из почвы .....	13
1.2. Методы долгосрочного хранения микроорганизмов .....	23
1.2.1. Криоконсервация .....	25
1.2.2. Лиофилизация .....	28
1.2.3. Метод низкотемпературного замораживания.....	32
1.3 Механизмы повреждений клеток в процессе консервации .....	34
1.4 Применение криопротекторов для защиты клеток микроорганизмов от повреждающих факторов.....	41
1.5 Методы исследования липидного бислоя и структурной организации мембран .....	49
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	53
2.1 Объекты исследования .....	53
2.2 Селективное выделение актиномицетов из почвы с добавлением сока алоэ древовидного .....	53
2.3 Состав питательных сред .....	54
2.4 Количественный учет актиномицетов и статистическая обработка результатов исследований .....	55
2.5 Изучение таксономического положения выделенных культур.....	56
2.6 Выделение фосфолипидных фракций из мембран актиномицетов .....	59
2.7 Определение компонентов фосфолипидных фракций.....	61
2.8 Измерение дифракционных спектров .....	61
2.9 Изучение антагонистических свойств актиномицетов .....	62
2.10 Изучение влияния адреналина, сока алоэ древовидного и тест-микроорганизмов на антибиотическую активность выделенных актиномицетов .....	63

2.11 Изучение влияния низкотемпературного замораживания на выживаемость и сохранение антибиотических свойств актиномицетов .....	64
РЕЗУЛЬТАТЫ .....	66
Глава 3. ИЗУЧЕНИЕ ФАЗОВО - СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ФОСФОЛИПИДНОЙ ФРАКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН АКТИНОМИЦЕТОВ .....	66
Глава 4. ХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР АКТИНОМИЦЕТОВ <i>Streptomyces hygroscopicus</i> RIA 1433 <sup>T</sup> , <i>Streptosporangium sp.</i> INA 34-06 и <i>Nonomuraea roseoviolacea subsp. carminata</i> INA 4281 МЕТОДОМ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ .....	78
Глава 5. ВЫДЕЛЕНИЕ РЕДКИХ РОДОВ АКТИНОМИЦЕТОВ ИЗ ПОЧВЫ С ДОБАВЛЕНИЕМ СОКА АЛОЭ .....	85
Глава 6. ИЗУЧЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВЫ С ДОБАВЛЕНИЕМ СОКА АЛОЭ .....	89
6.1. Определение таксономического положения выделенных культур .....	89
6.2 Изучение выделенных культур актиномицетов редких родов .....	92
6.2.1 Изучение культур актиномицетов рода <i>Micromonospora</i> .....	92
6.2.2 Изучение культур актиномицетов семейства <i>Streptosporangiaceae</i> .....	96
6.2.3 Изучение культур актиномицетов семейства <i>Nocardiaceae</i> .....	100
6.2.4 Изучение выделенных культур актиномицетов семейства <i>Thermomonosporaceae</i> .....	103
6.2.5 Изучение культур актиномицетов семейства <i>Pseudonocardiaceae</i> .....	108
6.2.6 Изучение культур актиномицетов семейства <i>Promicrospomonoraceae</i> ....	114
6.2.7 Изучение выделенной культуры рода <i>Kribella</i> .....	115
6.3 Изучение выделенных актиномицетов рода <i>Streptomyces</i> .....	117
6.4 Изучение влияния сока алоэ на антибиотическую активность выделенных культур актиномицетов редких родов .....	121

6.5 Хранение выделенных культур актиномицетов редких родов методом низкотемпературного замораживания .....	125
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	137
ВЫВОДЫ .....	138
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	139
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	141

## ВВЕДЕНИЕ

На протяжении последних лет во всем мире наблюдается рост устойчивости патогенных микроорганизмов к существующим антимикробным препаратам. Проблема поиска новых антибиотиков становится все более актуальной. Большинство известных антибиотиков получено на основе природных метаболитов, синтезируемых микроорганизмами - бактериями и грибами [Berdy, 2005; Butler, Bass, 2006; Newman, Cragg 2007, Khanna et al., 2011, Newman, Cragg 2016]. Более 90% антимикробных препаратов, используемых в медицине, выделено из актиномицетов [Hamaki et al., 2005].

Актиномицеты - продуценты разнообразных по химическому строению биологических соединений, обладающих антибактериальным, противогрибковым и противоопухолевым действием. Большинство антибиотиков выделено из актиномицетов широко распространенного рода *Streptomyces*. Стрептомицеты являются быстрорастущими микроорганизмами, они легко выделяются из природных источников и просты в культивировании [Berdy, 2005; Khanna et al., 2011; Tiwari, Gupta, 2012]. В настоящее время внимание исследователей нацелено на выделение и изучение представителей редких родов актиномицетов, которые могут быть потенциальными продуцентами новых, еще не изученных антибиотиков. Методом метагеномного анализа показано, что в природных источниках находится огромное количество актиномицетов, однако для получения новых антибиотиков необходимо выделение продуцентов в чистую культуру. Для поиска и выделения актиномицетов редких родов разрабатываются новые методы выделения из природных источников - почвы, водоемов, растений. Установлено, что актиномицеты редких родов трудно выделяемы, растут медленнее, чем стрептомицеты, более требовательны к источникам питания, часто не культивируемы [Long et al., 1994; Zengler, 2005; Berdy, 2005; Hamaki et al., 2005, Balts, 2007, Bull et al., 2005; Bredholt et al., 2008; Okoro et al., 2009; Hop D.V., 2011; Tiwari, Gupta, 2012, Genilloud, 2017, Pratiwi, 2018]. В то же время,

представители редких родов являются источником уникальных антибиотиков, таких как рифамицин (*Amycolatopsis mediterranei*), эритромицин (*Saccharopolyspora erythraea*), тейкопланин (*Actinoplanes teichomyceticus*), ванкомицин (*Amycolatopsis orientalis*), гентамицин (*Micromonospora purpurea*) и др. [Терехова и др., 1990; Berdy, 2005; Tiwari, Gupta, 2012].

После выделения актиномицетов в чистую культуру следует длительный процесс изучения новых культур и их метаболитов. На всех этапах изучения очень важно сохранить морфологические, физиологические и биохимические особенности микроорганизмов. Для этого разрабатываются методы длительного хранения культур, подбираются условия, позволяющие максимально сохранить биотехнологические свойства микроорганизмов. Выбор метода или разработка новых методов длительного хранения должны быть основаны на результатах исследований механизмов клеточных повреждений, возникающих в процессе консервации, а также на исследованиях механизмов сохранения микроорганизмов в мерзлотных почвах и ледниках. Известно, что главной причиной гибели клеток при замораживании или оттаивании является повреждение мембран. Изучение фазово – структурной организации мембранных липидов (основных компонентов мембран) позволяет существенно расширить знания о причинах этих повреждений.

Таким образом, поиск новых продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов и сохранение в течение длительного времени выделенных культур без потери жизнеспособности и ценных свойств, таких как синтез биологически активных соединений, является актуальной проблемой современной науки.

## Цель работы

Выделить из образцов дерново-подзолистой почвы и чернозема актиномицеты редких родов и изучить выживаемость и сохранение антибиотической активности выделенных культур и коллекционных штаммов актиномицетов при длительном хранении в условиях низких температур ( $-70^{\circ}\text{C}$ ).

## Задачи исследования:

1. Разработать и обосновать метод низкотемпературного хранения актиномицетов путем изучения:
  - А) фазово-структурной организации фосфолипидных фракций клеточных мембран коллекционных культур актиномицетов *Streptomyces hygrosopicus* RIA 1433T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06, используя метод дифракции рентгеновских лучей.
  - Б) влияния концентрации споровых суспензий на выживаемость данных коллекционных культур при длительном хранении при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .
  - В) влияния криопротектора (10% раствора глицерина) на выживаемость и антибиотическую активность коллекционных культур при длительном хранении при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .
2. Выделить из почвенных образцов культуры актиномицетов редких родов в целях создания коллекции для дальнейшего изучения, изучить их антибиотические свойства и определить таксономическое положение.
3. Изучить влияние сока *Aloe arborescens* на антибиотическую активность выделенных культур актиномицетов редких родов и коллекционных штаммов.
4. Заложить на хранение при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  выделенные культуры актиномицетов, изучить их жизнеспособность и сохранение антибиотической активности в течение длительного времени.

## Научная новизна

Впервые методом дифракции рентгеновских лучей получена информация о фазово-структурной организации фосфолипидных фракций актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06. Показано, что клеточные мембраны *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup> более устойчивы к повреждающим факторам, чем клеточные мембраны *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06. На основании полученных данных проведено исследование влияния низкотемпературного замораживания на сохранение жизнеспособности данных культур и сохранение ими антибиотической активности в течение длительного времени. Установлено, что при замораживании клеточных суспензий в концентрации  $10^5$ - $10^7$  КОЕ/мл коллекционные культуры сохраняют жизнеспособность, а также антибиотическую активность на высоком уровне. Показано, что 10% раствор глицерина (криопротектор) не оказывает влияния на выживаемость данных актиномицетов при хранении, высокую выживаемость культур обеспечивает высокая концентрация клеток в суспензии ( $10^5$ - $10^7$  КОЕ/мл). Показано, что при низких концентрациях клеток ( $10^2$  КОЕ/мл) в суспензии, сохраняет жизнеспособность лишь *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, культуры *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06 погибают.

Впервые установлено влияние сока алоэ (*Aloe arborescens*) на выделение актиномицетов редких родов. Показано, что при выдерживании почвенной суспензии с соком алоэ в течение 10 минут или 1 часа, увеличивается общее количество выделенных актиномицетов, при этом возрастает доля выделенных актиномицетов редких родов. Выделены в чистую культуру и изучены актиномицеты редких родов - *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinocorallia*, *Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*,



*Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Promicromonospora*, *Kribbella*. Показано, что сок алоэ оказывает не только ингибирующее действие на постороннюю микробиоту (грибы и немицелиальные бактерии), но и стимулирует рост продуцентов и образование антибиотиков у некоторых культур актиномицетов, выделенных при добавлении сока алоэ в почвенную суспензию. Установлено, что спорообразующие актиномицеты редких родов способны сохранять высокую концентрацию жизнеспособных клеток в течение длительного времени при хранении методом низкотемпературного замораживания. Способность актиномицетов к синтезу антибиотиков не утрачивается.

### **Практическая значимость**

Практическая значимость работы для микробиологии состоит в установлении зависимости фазово-структурной организации фосфолипидов клеточных мембран от качественного и количественного состава фосфолипидных фракций, уровня гидратации и времени хранения у разных видов актиномицетов. Полученные данные расширяют знания о процессах пространственной упорядоченности мембранных липидов и могут быть использованы для оптимизации условий хранения культур - продуцентов антибиотиков.

Установлено, что низкотемпературная консервация позволяет сохранять культуры актиномицетов в течение длительного времени без потери антибиотической активности. Данный метод может быть рекомендован для хранения культур актиномицетов.

Представлены и обоснованы рекомендации по использованию сока алоэ для увеличения количества и биоразнообразия актиномицетов редких родов при выделении их из почвы. Выявленное стимулирующее действие сока алоэ на синтез антибиотиков у штаммов-продуцентов позволяет использовать сок алоэ в качестве индуктора биосинтеза для некоторых культур актиномицетов.

Создана коллекция культур актиномицетов редких родов, которая насчитывает 101 штамм. Выделенные актиномицеты представляют интерес для дальнейшего изучения с целью получения новых биологически активных соединений, а также в области фундаментальных исследований.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Информация о фазово-структурной организации фосфолипидных фракций клеточных мембран актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06, полученная методом дифракции рентгеновских лучей, позволяет установить различие в строении клеточных мембран данных актиномицетов, а также изменения основных физических параметров в процессе хранения.
2. Хранение коллекционных культур актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 428, *Streptosporangium* sp. INA 34-06 и выделенных культур актиномицетов редких родов в концентрациях  $10^5$ - $10^7$  КОЕ/мл в условиях низких температур ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) позволяет сохранить высокую жизнеспособность и антибиотическую активность культур без использования криопротектора в течение длительного времени.
3. Добавление сока алоэ в почвенные суспензии позволяет увеличить количество выделенных актиномицетов редких родов и оказывает стимулирующее действие на их рост и антибиотическую активность.

### **Личный вклад автора**

Автором был проведен обзор, анализ и систематизация научно-методической литературы, посвященной проблематике работы. Автор принимал участие в подготовке образцов для дифракционных измерений и анализе полученных дифракционных спектров. Разработка и постановка

экспериментальных научных исследований, изложенных в диссертационной работе, а также анализ полученных результатов исследовательской работы были выполнены автором самостоятельно под руководством д.б.н., профессора, заслуженного деятеля науки РФ Тереховой Ларисы Петровны.

### **Апробация работы**

Основные положения были представлены на Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии (Москва, 2012), Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012), III Международной научно-практической конференции «Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития». (Краснодар, 2013), VII Московском Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013), на XIII съезде товарищества микробиологов Украины им. С.Н. Виноградского (Ялта, 2013), Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни (Москва, 2014), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» - 2015» (Москва, 2015), IV Международной конференции «Микробное разнообразие. Ресурсный потенциал. Биотехнология и современность». ICOMID 2016 (Москва, 2016), IX Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017), на 1-м Российском микробиологическом конгрессе (Пушино, 2017), Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний» (Москва, 2018).

Результата диссертационной работы были должны на заседаниях Ученого Совета и семинарах отдела микробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе (2008-2018 гг.).

## **Публикации**

По результатам исследований опубликовано 15 печатных работ, из них 4 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки Министерства науки и высшего образования РФ для публикации результатов диссертационных работ.

## **Объем и структура работы**

Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 4-х глав результатов исследований, обсуждения результатов, выводов, списка использованной литературы. Материалы диссертации изложены на 157 странице, содержат 21 таблицу и 23 рисунка. Список литературы включает 197 источников, в том числе 125 на иностранном языке.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Селективное выделение актиномицетов редких родов из почвы

В процессе поиска продуцентов биологически активных соединений, а также в экологических исследованиях применяется большое разнообразие методов селективной изоляции актиномицетов. В главе рассмотрены методы выделения актиномицетов редких родов из почвы.

Актиномицеты – это грамположительные мицелиальные бактерии, отнесенные к филуму *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales* [Ventura et al., 2007].

Биологически активные соединения, выделенные из актиномицетов, обладают антибактериальным, антифунгальным, противоопухолевым действием, подавляют развитие возбудителей паразитарных заболеваний. Большинство существующих антибиотиков выделено из культур рода *Streptomyces*, меньшая часть - из представителей редких родов (*Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Saccharopolyspora*, *Streptoverticillium*, *Nocardia*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*) [Berdy, 2005].

Актиномицеты, не относящиеся к роду *Streptomyces*, принято называть редкими. Культуры редких родов актиномицетов трудно выделяются из природных источников, сложны в культивировании и хранении при обычных условиях. В тоже время, актиномицеты редких родов продуцируют большое количество разнообразных, уникальных, иногда очень сложных соединений, показывающих высокую антибактериальную активность и часто низкотоксичных [Berdy, 2005]. Антибиотики, синтезируемые актиномицетами редких родов, имеют очень важное практическое значение для медицины: антибиотики широкого спектра действия из группы аминогликозидов – гентамицин, сизомицин (*Micromonospora*) и тобрамицин (*Streptoalloteichus*); противотуберкулезный антибиотик рифамицин из группы анзамицинов (*Amycolatopsis*); полициклические гликопептиды ристомицин, ванкомицин (*Amycolatopsis*) и тейкопланин

(тейхомицин) (*Actinoplanes*); макролидные антибиотики эритромицин (*Saccharopolyspora*) и розамицин (*Micromonospora*); противоопухолевый антибиотик карминомицин (*Actinomadura*) [Терехова и др., 1990; Berdy, 2005; Tiwari, Gupta, 2012]. Вещества, применяемые в сельском хозяйстве: зирацин, далбаванцин, спинозин являются соединениями, выделенными из актиномицетов редких родов [Berdy, 2005].

Представители почти всех известных родов актиномицетов выделены из почвы. Для направленного выделения культур определенных групп актиномицетов необходимо знать закономерности распределения актиномицетов в почвах. Низкие значения рН лесных подзолистых почв способствуют развитию в них представителей рода *Streptosporangium*, наиболее благоприятными местообитаниями для олигоспоровых актиномицетов (*Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Microbispora*, *Thermomonospora*) в хвойных лесах оказались нижние слои подстилки и верхний горизонт почвы, обогащенные растительными остатками. В почвах степных биогеоценозов доминантами, кроме представителей рода *Streptomyces*, являются представители родов *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Nocardia*, меньшую долю составляю представители родов *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Streptosporangium* [Звягинцев и др., 2005].

Для выделения представителей редких родов из мест их естественного обитания широко применяются методы селективной изоляции. Эти методы основаны на различиях в питательных потребностях, физиологических свойствах, спектрах чувствительности к антибиотикам и другим ингибиторам роста у разных групп микроорганизмов.

Добавление антибиотиков в питательные среды помогает ингибировать рост сопутствующих грибов, немикелиальных бактерий и быстро растущих актиномицетов рода *Streptomyces*, таким образом, создаются благоприятные условия для роста и выделения медленно растущих редких культур. В качестве селективных агентов широко используют антибиотики: канамицин, рифампицин, рубомицин, стрептомицин, брунеомицин, новобиоцин, нистатин и др.

Установлено, что различные антибиотики, используемые в качестве селективных агентов, обеспечивают преимущественное выделение культур определенных родов или групп родов актиномицетов. Например, рубомицин наиболее благоприятен для выделения культур рода *Actinomadura*, на среде со стрептомицином преобладают культуры нокардиального типа, новобиоцин способствует преимущественному выделению микромоноспор. Тобрамицин, антибиотик группы аминогликозидов, способствует выделению культур родов *Micromonospora*, *Amycolatopsis*, *Streptosporangium*, *Saccharotrix* [Терехова и др., 1990].

Для выделения культур редких родов актиномицетов применяют также комбинации различных типов антибиотиков. Использование смеси канамицина, норфлоксацина и налидиксовой кислоты позволило выделить представителей *Microtetraspora* spp. [Hayakawa et al., 1996]; фрадомицина, канамицина, налидиксовой кислоты и триметоприма – *Acinetospora* spp. [Otoguro et al., 2001]; канамицина, йозомицина, налидиксовой кислоты и лизоцима – *Actonomadura viridis* [Hayakawa et al., 1995].

Предварительное изучение чувствительности штаммов различных родов актиномицетов к ингибитору роста (антибиотику) позволяет определить с большой долей вероятности, какие таксономические группы можно выделять с применением данного вещества и в каких концентрациях его необходимо использовать. Так, например, после сравнительного изучения чувствительности к ряду антибиотиков коллекционных и свежевыделенных культур разных видов, относящихся к роду *Actinomadura*, было установлено, что для направленного выделения лучше всего подходит рубомицин в концентрации 5 мкг/мл [Терехова и др., 1990].

Предварительная обработка образцов почвы химическими веществами является эффективным методом для селективной изоляции актиномицетов.

Споры стрептомицетов и вегетативные клетки представителей родов *Bacillus* и *Pseudomonas* погибают при действии фенола (1,5%), глюконата хлоргексидина (0,01%) и хлорида бензетония (0,01%) в течение 30 минут при

30<sup>0</sup>С. В то же время, споры культур родов *Micromonospora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Microtetraspora* устойчивы к данным веществам. Для селективного выделения культур вышеперечисленных родов предложена предобработка почвенных суспензий фенолом, глюконатом хлоргексидина и хлоридом бензетония [Найакawa., 2003].

Селективному выделению актиномицетов родов *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Streptosporangium*, *Herbidospora*, относящихся к семейству *Streptosporangiaceae*, способствует предобработка почвы 1% раствором хлорамина Т с последующим высевом на HV – агар [Найакawa et al., 1997].

Хлорамин В обладает микробицидным действием на широкий круг организмов, являясь сильным окислителем. Хлорноватистая кислота, выделяющаяся при реакции хлорамина В с водой, оказывает дополнительный антимикробный эффект [Красильников, 1995]. Для выделения олигоспоровых актиномицетов родов *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Actinomadura*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* была предложена предобработка почвенных образцов растворами хлорамина В [Михайлова, 1999].

Tsao с соавторами был разработан метод выделения актиномицетов из почвы, который заключался в инкубации образцов почвы с карбонатом кальция [Tsao et al., 1960]. Более поздние исследования показали, что ионы кальция играют значительную роль в дифференциации актиномицетов: они влияют на способность образовывать воздушный мицелий [Natsume et al., 1988]. При использовании модификации данного метода удалось увеличить количество выделенных актиномицетов разных родов, в том числе и редких: *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Amycolatopsis*, *Nocardiosis*, *Nocardioides*, *Promicromonospora*, *Streptosporangium* [Алферова, Терехова, 1988].

Дрожжевой экстракт и додецилсульфат натрия являются активаторами прорастания спор актиномицетов, а раствор фенола - ингибитором нежелательной микробиоты. При обработке данными веществами почвенной суспензии существенно увеличивается количество культур рода *Streptosporangium* [Agrawal, Goodfellow, 1990].



Таким образом, различные химические вещества оказывают как стимулирующее, так и ингибирующее действие на микробиоту почвы. Применение комбинаций химических веществ при обработке природных субстратов приводит к высокой селективности выделения определенных таксонов актиномицетов.

Для культур родов *Actinoplanes*, *Dactylosporangium* и некоторых других характерно наличие подвижных зооспор, на этом основании были разработаны методы химических “приманок”. В качестве аттрактантов были использованы аминокислоты, ароматические соединения и сахара. Результаты показали, что  $\gamma$ -коллин является универсальным аттрактантом для выделения актиномицетов, принадлежащих к родам *Actinoplanes* и *Dactylosporangium* [Hayakawa et al., 1991].

Для выделения актиномицетов применяют также предварительную обработку природных субстратов физическими факторами.

Среди актиномицетов существуют психрофилы - микроорганизмы устойчивые к низким температурам. Из слоя ледника Антарктиды с глубины 85 метров (имеющего возраст приблизительно 2200 лет) был выделен и описан представитель нового вида *Nocardiopsis antarcticus* [Абызов и др., 1983], из антарктического песчаника выделен новый вид *Micromonospora endolithica* [Hirsch, Christensen, 1982]. Обнаружены также психротолерантные актиномицеты, принадлежащие к родам *Micromonospora*, *Nocardia*, *Promicromonospora* [Xu et al., 1996]. При изучение микробиоты Антарктических почв и ледников были выделены в чистую культуру актиномицеты рода *Streptomyces* [Encheva-Malinova et al., 2014; Dimitrova et al., 2013; Kamjiam et al., 2019]. Среди методов предварительной обработки при помощи низких температур используют метод замораживания – оттаивания, что позволяет выделять из образцов почвы в 1.2 – 3.6 раза больше актиномицетов, чем из контроля [Anghelescu et al., 1977].

Существует также большая группа термофильных актиномицетов (*Thermomonospora viridis*, *Thermomonospora curvata*, *Thermomonospora fusca*, *Micromonospora chalcea*, *Actinomadura* sp. и др.) [Takahashi et al., 1992; Ethier, 1994; Stutzenberger, 1994; Gallagher et al., 1996]. Предварительная обработка

сухим жаром при 100<sup>0</sup>С почвенных образцов из пещер северного Тайланда позволила выделить 50 видов культур редких актиномицетов, принадлежащих к родам *Micromonospora*, *Saccharomonospora*, *Nonomuraea*, *Cetellatospora*, *Spirillospora*, *Microtetraspora* и *Saccharotrix* [Lumyong et al., 2007]. В результате предварительной обработки сухим жаром при температуре 120<sup>0</sup>С в течение 1 часа были выделены актиномицеты родов *Dactylosporangium*, *Microbispora*, *Streptosporangium*. Обработка сухим жаром при 100<sup>0</sup>С в течение 15 минут была эффективна для выделения культур рода *Actinimadura* [Jiang et al., 2016].

Известно, что различные группы актиномицетов обладают неодинаковой чувствительностью к ультрафиолетовому (УФ) облучению. После предварительной обработки почвенной суспензии УФ – облучением наблюдалось снижение количества выделенных культур, относящихся к роду *Streptomyces*, в то же время культуры редких родов оказались более устойчивыми к УФ-облучению. Наибольшей устойчивостью обладали культуры рода *Micromonospora* [Галатенко и др., 1990].

Стимулирующий эффект на прорастание спор микроорганизмов оказывает действие магнитных полей различной мощности [Давидков и др., 1983]. При длительном выдерживании почвенных образцов в магнитном поле (две недели при 28<sup>0</sup> С), количество выросших актиномицетов увеличилось по сравнению с контролем, с ростом напряженности магнитного поля ускорялся и рост актиномицетов [Павлович, 1979].

Метод концентрирования образцов воды фильтрацией через мембранные фильтры основан на различии размеров спор актиномицетов, грибов и немицелиальных бактерий [Polsinelli, Mazze, 1984]. Таким же способом были выделены культуры рода *Thermoactinomyces* [Al-Diwany et al., 1978]. Существуют методы, основанные на способности гиф актиномицетов прорасти через поры малого диаметра [Hirsh et al., 2004, Hanka, Schaadt, 1988]. Использование фильтров малого диаметра 0,2  $\mu\text{m}$  позволило полностью исключить рост сопутствующих грибов без применения противогрибных агентов. С помощью данного метода были выделены актиномицеты таких редких родов как

*Dactylosporangium, Catellatospora, Catenulispora, Lentzea, Streptacidiphilus* [Gavriš et al., 2008].

С целью десорбции, экстракции спор и мицелия актиномицетов с поверхности частиц природных субстратов применяют обработку образцов ультразвуком [Miquely et al., 1993].

Обработка КВЧ излучением в диапазоне волн от 3,8 до 5,8 мм оказалась эффективной для выделения актиномицетов группы родов *Actinomadura, Saccharothrix, Nonomuraea, Amycolatopsis, Pseudonocardia*. Существенно возросла доля выделенных актиномицетов родов *Actinomadura, Microtetraspora* и *Nonomuraea* при обработке почвенных суспензий КВЧ-излучением в диапазоне волн от 8 до 11,5 мм [Terekhova, 2003]. При обработке КВЧ почвенных образцов Воронежской области была выделена новая культура *Actinomadura* sp. ИНА 654 – продуцент эхиномицина, обладающий противоопухолевым действием. Образование эхиномицина представителем рода *Actinomadura* было обнаружено впервые [Галатенко и др., 2006].

Разработаны методы выделения культур редких родов актиномицетов из почвы с применением обработки почвенных образцов СВЧ-волнами и электрическими импульсами. Показано, что при этом доля выделенных актиномицетов увеличивается в среднем в три раза по сравнению с контролем [Terekhova, 2003].

Для выделения редких родов актиномицетов применяют комплексные методы, т.е. предварительную обработку почвенных образцов химическими веществами или физическое воздействие сочетают с последующим высевом образцов на селективные среды.

Олигоспоровые актиномицеты родов *Actinomadura, Saccharopolyspora, Saccharomonospora, Microbispora, Thermomonospora* являются минорными, но постоянными представителями почвенных актиномицетных комплексов. Для выделения представителей этой группы актиномицетов в качестве предпосевной обработки почвенных образцов применяли прогревание при 120<sup>0</sup>С для чернозема и 105<sup>0</sup>С для торфа в течение 1 часа. Приготовление почвенных суспензий

проводили в растворе хлорамина Б. Инкубация посевов проходила при 28<sup>0</sup>С в течение 3-4 недель. В качестве селективного приема для выделения из почвы представителей рода *Microbispora* в питательную среду добавляли левомецетин в концентрации 2.5 мг/мл, что приводило к увеличению численности микробиспор на 3-4 порядка [Зенова и др., 2002].

Обработка почвенного образца сухим жаром при температуре 110<sup>0</sup> С в течение 15 минут и посев на среду с антибиотиками привела к селективной изоляции актиномицетов рода *Actinobispora* [Suzuki et al., 2000].

Для выделения актиномицетов рода *Planomonospora* использовали обработку почвы раствором снятого молока в N- циклогексил – 2- амино – этансульфоновой кислоты (рН=9.0) и двукратное центрифугирование [Suzuki et al., 2001].

Культуры рода *Actinopolymorpha* были выделены также с использованием комплексного метода: почву помещали в богатую среду с двумя антибиотиками - пенициллином и стрептомицином, затем инкубировали, центрифугировали и промывали [Wang et al., 1993].

Для выделения зооспор актиномицетов родов *Actinoplanes* и *Dactylosporangium* применяли выдерживание почвенного экстракта в течение 90 минут при температуре 30<sup>0</sup>С в фосфатном буфере. Последующее центрифугирование при 1500 оборотах в течение 20 минут позволило устранить актиномицеты рода *Streptomyces* и представителей других «неподвижных» родов актиномицетов. Добавление в питательную среду (HV-агар) налидиксовой кислоты и триметоприма ингибировало рост грамотрицательных бактерии и бактерии рода *Bacillus*. Кроме актиномицетов родов *Actinoplanes* и *Dactylosporangium*, с помощью данного метода были выделены культуры таких родов как *Actinokineospora*, *Catenuloplanes* и *Kineospora* [Hayakawa et al., 2000].

Предобработка почвенных суспензий ультразвуком в сочетании с обработкой фенолом (1.5%) и/или сухим жаром (100<sup>0</sup>С) в течение 1 часа и высевом на питательные среды, содержащие антибиотики (циклогексимид,

нистатин, налидиксовая кислота), способствует селективному выделению представителей рода *Micromonospora* [Qiu et al., 2008].

Различные комбинации, сочетающие предобработку сухим жаром, изменение pH питательных сред и обработку солями кальция позволили выделить из образцов пород карстовых пещер актиномицеты, отнесенные к 30 редким родам [Fang et al., 2017].

Важной группой методов как для выявления актиномицетов в почве, так и для селективного выделения являются методы с использованием фагов. Для выделения культур редких родов актиномицетов применяют стрептофаги, лизирующие колонии культур рода *Streptomyces*. Уменьшение количества стрептомицетов, приводило к увеличению количества актиномицетов редких родов. Интенсивный лизис стрептомицетальных колоний не изменялся в течение длительного инкубационного периода, который необходим для роста других родов актиномицетов [Kurtböke et al., 1992]. Кроме фагов, активных в отношении колоний актиномицетов, существуют фаги, лизирующие колонии немителиальных бактерий, что позволяет увеличить количество актиномицетов [Kurtböke et al., 1992; McKenna, 2002].

Известно, что в почве происходит последовательная смена микробных сообществ, которая имеет сезонный характер [Одум, 1986; Заварзин, Колотилова, 2001]. В настоящее время установлено, что на определенных этапах сукцессии редкие роды актиномицетов могут иметь равную со стрептомицетами долю в актиномицетном комплексе, а иногда и доминировать в нем. Сукцессионные изменения в комплексе актиномицетов существенно зависят от влажности почв, т.е. в одной и той же почве микробная сукцессия может развиваться по разным маршрутам. Более высокие значения плотности популяции для стрептомицетов зарегистрированы при небольшом увлажнении почвы, тогда как для микромоноспор и сахаромоноспор в большинстве случаев относительные максимумы зарегистрированы при полевой влагоемкости почвы -1 и -5 Мпа. Периоды максимального обилия для представителей постоянно выделяющихся из почвы четырех родов актиномицетов - *Streptomyces*, *Streptosporangium*,

*Micromonospora*, *Saccharomonospora* отмечены на разных этапах сукцессии, что позволяет установить наиболее благоприятные периоды и условия для выделения представителей конкретных таксонов [Звягинцев, Зенова, 2001].

При исследовании динамики олигоспоровых актиномицетов в ходе сукцессии, инициированной увлажнением чернозема, были выявлены наиболее благоприятные для их выделения временные промежутки и условия сукцессии. Установлено, что представителей родов, предварительно идентифицированных как *Microbispora* и *Saccharopolyspora*, лучше выделять на ранних (7 сутки после инициации сукцессии) и поздних (42 сутки) этапах сукцессии [Зенова и др., 2000].

Следовательно, использование сукцессионного подхода в сочетании с методами посева позволяет обнаружить представителей редких родов актиномицетов и определить временные промежутки, обеспечивающие максимальную плотность их популяций в почве.

Отдельного внимания заслуживают методы выделения с помощью веществ животного и растительного происхождения. Биогенные амины (серотонин, адреналин, норадреналин, дофамин и др.) способны стимулировать рост бактерий и дрожжей [Кагарлицкий и др., 2003]. В исследовании Филипповой с соавторами было показано, что гормональные соединения из группы катехоламинов - дофамин и адреналин, стимулируют прорастание спор и стабилизируют популяционный состав штамма-продуцента эритромицина *Saccharopolyspora erythraea* [Филиппова и др., 2010]. Исходя из этих данных, можно было предположить, что адреналин будет оказывать стимулирующее действие на прорастание спор других родов актиномицетов.

В более поздних исследованиях было показано, что добавление в питательную среду веществ из группы катехоламинов (адреналин), ауксинов (гетероауксин) и препарата «Циркон» для активации прорастания спор, существенно увеличивает долю выросших актиномицетов, в том числе возрастает численность и разнообразие выделенных культур редких родов актиномицетов. Показано, что адреналин и гетероауксин способствуют селективной изоляции

культур редких родов актиномицетов: *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Nonomuraea* и *Catellatospora* [Мачавариани, Терехова, 2013, Куликова, 2017].

Несмотря на большое количество существующих работ по селективному выделению актиномицетов из почвы, разработка новых методов является актуальной. Прорывом в современной микробиологии стала возможность исследования микробных сообществ во всем их природном многообразии. Технологии высокопроизводительного секвенирования позволяют работать с большими объемами генетической информации. Метагеномные исследования показали, что в почве содержится огромное количество бактериальных геномов, которое во много раз превышает разнообразие тех организмов, которые выделяются в чистую культуру, т.е. в лабораторных условиях выделена лишь незначительная часть микроорганизмов, существующих в природе [An et al., 2013; Lienhard et al., 2014; Stomeo et al., 2012, Першина, Андронов, 2017].

## **1.2 Методы долгосрочного хранения микроорганизмов**

Важными условиями работы с микроорганизмами являются поддержание штаммов в рабочем состоянии и сохранение их ценных свойств. Обширный опыт работы с коллекциями свидетельствует о том, что ряд современных методов консервации оказывается относительно эффективным при поддержании лабораторных культур микроорганизмов [Похиленко и др., 2009].

Хранение микроорганизмов в течение длительного периода времени без утраты ценных свойств проводится методами, которые обеспечивают существенное торможение протекающих в них жизненных процессов. Эти методы основаны на способности микроорганизмов впадать в состояние анабиоза. Анабиоз широко распространен в природе. В этом состоянии могут находиться микроорганизмы, покоящиеся стадии растений, простейшие, некоторые наземные беспозвоночные, отдельные насекомые, изолированные

клетки, органы и эмбрионы позвоночных животных, в том числе человека [Бекер и др., 1987].

Основными признаками анабиотического состояния являются:

- отсутствие или предельное торможение метаболизма;
- сохранение структуры в течение продолжительного времени;
- отсутствие в жидкой фазе заметных количеств свободной воды;
- повышенная устойчивость против экстремальных факторов;
- способность восстанавливать процессы жизнедеятельности [Бекер и др., 1987].

Несмотря на постоянное углубление наших знаний в области генетики, биохимии, физиологии и экологии микроорганизмов, мы все еще далеки от понимания полной картины о процессах, ответственных за обратимый переход клеток микроорганизмов в анабиотическое состояние [Похиленко и др., 2009].

В последние годы в большинстве коллекций микроорганизмов используют методы лиофилизации, криоконсервации и низкотемпературного замораживания. Выбор способа хранения конкретного объекта основывается на сохранении микроорганизмами жизнеспособности, морфологических признаков, физиологических характеристик, биохимической и генетической стабильности. Также нужно учитывать максимально возможное время хранения культуры и надежность данного метода, в том числе требования по обслуживанию в течение длительного времени. Состав среды, температура, условия аэрации и другие факторы оказывают существенное влияние на устойчивость микроорганизмов к стрессам, возникающим при длительном хранении. Для повышения устойчивости микроорганизмов к воздействию низких температур применяются защитные вещества – криопротекторы, такие как пропиленгликоль, этиленгликоль, диметилсульфоксид, глицерин и др. [Похиленко и др., 2009; Малахаева и др., 2015; Грачева, Осин, 2014; Ryan, Smith, 2007; Hübalek, 2003; Бланков, Клебанов, 1961; Шендеров и др., 1998].



### 1.2.1 Криоконсервация

Большинство бактерий способны длительно храниться в замороженном состоянии при низких (криогенных) температурах (температуры ниже 120 К, т.е. менее минус 153 °С). Данную температуру хранения обеспечивают сжиженные газы – воздух, азот, неон, водород, гелий, которые находятся в специальных сосудах с хорошей теплоизоляцией, например, сосудах Дьюара. Испаряясь под атмосферным давлением, эти газы в сжиженном состоянии достаточно хорошо поддерживают постоянную температуру нормального кипения каждого из них. На практике чаще всего используется жидкий азот, так как он более доступен и безопасен в использовании. Этим методом консервируют самые различные биоматериалы – актиномицеты, бактерии, дрожжи, грибы, вирусы растений и животных, культуры клеток и т.д. [Похиленко и др., 2009; Цуцаева и др., 2008].

Процесс криоконсервации включает три стадии:

1. Подготовка культуры: клетки выращивают в соответствующей среде. Наилучшей криоустойчивостью обладают клетки, собранные в конце логарифмической фазы или в начале стационарной фазы. При росте культур в жидких средах, клетки центрифугируют, затем ресуспендируют осадок в стерильной среде, которая содержит криопротектор. Выращенные на агаре культуры смывают с его поверхности стерильной жидкой средой, содержащей криопротектор. Для большинства микроорганизмов концентрация клеток в образцах должна быть  $10^7$  КОЕ/мл.

2. Заполнение емкостей: консервируемые пробы разливают в стерильные емкости, устойчивые к криогенным температурам (криопробирки, криовials, пластиковые соломинки), которые герметично закрывают или запаивают.

3. Замораживание: криопробирки с культурой помещают в специальные контейнеры, которые ставят в морозильную камеру автоматического

низкотемпературного холодильника и устанавливают определенную скорость охлаждения; замораживают клетки при контролируемой скорости охлаждения. После охлаждения криопробирок до температуры  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , образцы переносят в сосуд с жидким азотом и хранят в нем при температуре минус  $196\text{ }^{\circ}\text{C}$  или над ним в парах азота при температуре минус  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ . [Микулинский и др., 1991; Похиленко и др., 2009; Simione, 2006; Ryan, 2004].

С помощью более современного оборудования пробы консервируют следующим образом:

- клеточный материал, подготовленный к хранению, закладывается в специальные пластиковые контейнеры;
- пластиковые контейнеры помещают в программный замораживатель, где начинается процесс охлаждения по специальной программе, которую можно менять по необходимости.

Извлечение, загрузка образцов осуществляются с помощью механической руки, управляемой компьютером. Каталогизация образцов ведется с использованием системы штрихкодов [Похиленко и др., 2009].

Эффективность сохранения микроорганизмами жизнеспособности и продуктивных свойств зависит от способов перевода и вывода их из состояния глубокого холодового анабиоза. В связи с этим для представителей различных родов, видов и штаммов микроорганизмов разрабатываются, при необходимости, индивидуальные эффективные технологии криоконсервирования, предусматривающие сохранение максимального количества жизнеспособных клеток без изменения их исходных свойств [Цуцаева и др., 2008].

При разработке технологического процесса учитываются следующие факторы: условия культивирования и фаза роста культуры, концентрация клеток, режим охлаждения и температура отогрева, состав консервирующей среды, родовые и морфофункциональные особенности клеток и др. [Желобецкая и др., 2008; Цуцаева и др., 2008].

Изучение морфофункциональных свойств промышленных микроорганизмов, относящихся к родам *Streptomyces*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Anabaena*, *Synechocystis*, *Nostoc*, *Spirulina*, и бактериофагов Т3, Т4, фХ174, хранившихся в жидком азоте в течение 15-20 лет, показало, что криоустойчивость данных микроорганизмов зависит от их таксономической принадлежности, физиологического состояния и режимов криоконсервирования. Большинство микроорганизмов обладало высокой криоустойчивостью в стационарной фазе роста. У молочнокислых стрептококков (*Streptococcus cremoris*) криоустойчивость возрастала с увеличением их концентрации в среде консервирования. В то же время увеличение концентрации цианобактерий в суспензии не приводило к повышению числа жизнеспособных клеток после криоконсервирования [Цуцаева и др., 2008].

Было установлено, что высокие скорости охлаждения ( $30^{\circ}$ - $40^{\circ}$ С/мин) оптимальны для энтомопатогенных бактерий, молочнокислых стрептококков, споровых культур стрептомицетов. Для бифидобактерий, вегетативных клеток стрептомицетов, бактериофагов Т4 и фХ174 и различных рас хлебопекарных дрожжей оптимальными были низкие и средние скорости охлаждения ( $0,1$ - $0,4^{\circ}$ С/мин;  $1$ - $4^{\circ}$ С/мин;  $10$ - $40^{\circ}$ С/мин) [Цуцаева и др., 2008].

Для промышленного штамма молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* 377D было показано, что высокую жизнеспособность обеспечивает замораживание по двум программам: 1) – охлаждение со скоростью  $1^{\circ}$ С/мин до  $-40^{\circ}$ С и дальнейшее погружение в жидкий азот; 2) - охлаждение со скоростью  $5^{\circ}$ С/мин до  $-40^{\circ}$ С и дальнейшее погружение в жидкий азот [Желобецкая и др., 2008].

Наибольшая криоустойчивость отмечалась у спорообразующих микроорганизмов. Скорость отогрева образцов также оказывает влияние на сохранение жизнеспособность клеток. Так, для бактериофагов оптимальны низкие температуры отогрева ( $1,5$ - $4,1^{\circ}$ С), а для бактерий и дрожжей в интервале от  $30^{\circ}$ С до  $41^{\circ}$ С. [Цуцаева и др., 2008].

Результаты исследований показали, что различной криоустойчивостью обладают микроорганизмы не только разных родов, видов, но и разных штаммов. Разные штаммы бактериофагов также обладали различной криоустойчивостью. Наиболее устойчивым при криоконсервировании оказался фаг Т3, промежуточное положение занимал фХ174, наиболее криолабильным оказался фаг Т4 [Цуцаева и др., 2008].

Таким образом, перед закладкой микроорганизмов на длительное хранение необходимо разрабатывать индивидуальные режимы криоконсервирования, позволяющие сохранить максимальное количество жизнеспособных клеток без изменения исходных свойств.

### 1.2.2 Лиофилизация

Впервые метод лиофилизации был применен Альтманном в 1890 году для обезвоживания кусочков органов и тканей при гистологических исследованиях. В 1909 году Шаккель провел замораживание в смеси льда и соли (NaCl) с последующим поглощением влаги серной кислотой. Такой метод стал использоваться для высушивания крови и антисыворотки, а затем и вируса бешенства. В 1911 году Хаммер провел криоконсервацию *Escherichia.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas pyocyanea*. Позже Свифт применил данный метод для стрептококков, пневмококков, бактерий паратифозной и дизентерийной групп. При этом Свифт заменил серную кислоту в качестве адсорбента паров на  $P_2O_5$  и впервые применил для замораживания твердую углекислоту вместо смеси льда и NaCl. После этого метод лиофилизации стал широко применяться в ветеринарной, медицинской, биологической практике и в пищевой промышленности для длительного сохранения бактерий, вирусов, грибов, диагностических и лечебных препаратов, животных и растительных тканей, продуктов [Бланков, Клебанов, 1961].

Метод лиофилизации заключается в замораживании культур и в последующем высушивании их из этого состояния под вакуумом. Лиофилизированные культуры могут храниться в течение длительного времени, если их хранить без доступа кислорода, влаги и света при пониженных температурах. Лиофилизация обеспечивает для широкого круга микроорганизмов большую стабильность, чем общеизвестные способы высушивания и периодических пересевов. Метод лиофилизации удобен для практических целей, т.к. дает возможность иметь большое число ампул каждой культуры. Однако титр жизнеспособных клеток микроорганизмов в результате лиофилизации часто оказывается низким и довольно быстро падает при хранении даже при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Кроме того, многие неспорообразующие микроорганизмы не переносят обычно используемые режимы лиофилизации и не могут храниться этим методом. Установлено также, что процесс лиофилизации приводит к отбору наиболее устойчивых клеток в культуре, которые могут и не обладать желаемыми свойствами [Шендеров и др., 1998].

Техника лиофилизации включает три стадии:

- 1) Замораживание биоматериалов при температурах ниже эвтектических значений (при которых растворы защитных сред полностью замерзают).
- 2) Первичное высушивание, в течение которого замороженная вода удаляется при субнулевых температурах.
- 3) Вторичное высушивание, при котором из визуально сухого препарата при положительных температурах удаляется незамороженная вода, прочно связанная с биомолекулами. [Похиленко и др., 2009; Perry, 1998; Грачева, Осин, 2016].

Успех лиофилизации зависит от качества используемых клеток, от того, насколько они жизнеспособны и в каких условиях выросли. Выращивают достаточно большое количество клеток так, чтобы в суспензии содержалось не менее  $10^8$  КОЕ/мл. Их собирают в период максимальной стабильности и жизнеспособности культуры, т.е. в поздней экспоненциальной или ранней стационарной фазе роста [Похиленко и др., 2009; Бланков, Клебанов, 1961].

Для снижения воздействия множества повреждающих факторов микроорганизмы предварительно помещают в различные защитные среды (стабилизаторы): сыворотку крови животных, альбумин, обезжиренное молоко, желатин, сахарозу или их комбинации [Похиленко и др., 2009; Ryan, Smith, 2007; Герна, 1983].

Замораживание микроорганизмов проводят в морозильных камерах при температуре от  $-70^{\circ}\text{C}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$  или путем помещения материала в смесь спирта с сухой углекислотой. Затем замороженные культуры в ампулах или флаконах быстро переносят в сушильную камеру (сублиматор), в которой создается глубокий вакуум и поддерживается пониженная температура (до  $-40^{\circ}\text{C}$ ). В результате сублимации свободная вода удаляется с поверхности замороженного материала, и препарат переходит из твердого (замороженного) состояния в сухое (пористая масса, почти не измененная в объеме). Таким образом, получают лиофильно высушенный материал, который представляет собой пористую легко растворимую массу [Никитин, Звягин, 1971].

Ампулы или флаконы после высушивания быстро укупоривают, чтобы избежать увлажнения препарата при хранении. Ампулы запаивают, предварительно создавая в них вакуум или заполняя их инертным газом. Запаенные ампулы хранят при температуре  $+5^{\circ}\text{C}$ . Хранение при комнатной температуре не рекомендуется [Похиленко и др., 2009; Никитин, Звягин, 1971].

Качество лиофилизации оценивается по следующим параметрам:

- 1) быстрая растворимость препарата (1-2 минуты);
- 2) остаточная влажность, не превышающая 3-5% (к весу сухого вещества);
- 3) исходная вязкость препарата после растворения;
- 4) сохранение активности, специфичности и других свойств [Никитин, Звягин, 1971].

Основным показателем, по которому оценивают эффективность лиофилизации, является остаточная влажность. Данный параметр можно проверить, помещая в ампулы перед их запаиванием стерильные индикаторные

бумажки, пропитанные 2% раствором хлористого кобальта. В атмосфере, лишенной следов влаги, индикаторные бумажки имеют синий цвет. В присутствии свободной влаги – розовеют [Герна, 1983].

От качества проведения процесса лиофилизации зависит сохранение жизнеспособности и стабильности консервируемых культур в течение требуемого срока хранения [Бланков, Клебанов, 1961].

Считается, что из всех групп микроорганизмов лучше переносят лиофилизацию бактериальные формы. По устойчивости к сушке бактерии подразделяют на три группы:

– очень стойкие, такие как представители родов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *Bacillus* и т.д. Их жизнеспособность после сушки составляет 70-100 %.

– средне резистентные, например представители родов *Brucella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Pseudomonas*. Их выживание достигает 70 %;

– чувствительные к высушиванию – некоторые представители родов *Spirochete*, *Methylobacter*, *Methylococcus* [Похиленко и др., 2009].

Реактивация культур после хранения является важным этапом работы: выживаемость микроорганизмов может существенно снизиться из-за окислительного воздействия кислорода. Поэтому для восстановления жизнеспособности микроорганизмов на этом этапе используют вещества с антиоксидантной активностью: токоферолы, флавоноиды катехоламины и другие биологически активные соединения. Реактивацию культур проводят непосредственным высевом сухого материала на питательные среды или с предварительной регидратацией лиофилизированного материала. Предварительная регидратация может заключаться в выдерживании клеток во влажной камере, супендировании в воде или специально подобранной среде [Филиппова и др., 2012; Chen et al., 2006].

Необходимо проверять чистоту культуры до лиофилизации и после нее. Для этого суспензию клеток стерильно разводят и делают посев штрихом на твердые среды. Пробирки и чашки со средой инкубируют при оптимальной

для бактерий температуре и, как только начинается их рост, делают пересев на свежую среду, чтобы убедиться в чистоте культуры. Рост бактерий, подвергавшихся лиофилизации, часто начинается после длительной лаг-фазы. Поэтому нельзя делать заключение о гибели культуры, если инкубация была недостаточно длительной. Чтобы определить, насколько эффективен процесс высушивания бактерий из замороженного состояния, проверяют их жизнеспособность как до, так и после лиофилизации [Похиленко и др., 2009].

### 1.2.3 Метод низкотемпературного замораживания

Одним из современных методов консервации бактерий является замораживание и хранение при температурах в диапазоне от  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $-85^{\circ}\text{C}$ , стабильное поддержание которых обеспечивают современные лабораторные холодильники [Грачева, Осин, 2014; Каменских и др., 2010].

Техника проведения замораживания довольно проста: культуры микроорганизмов выращивают на специализированных агаровых средах до стационарной фазы, затем смывают защитной средой или дистиллированной водой с добавлением криопротектора, криопробирки помещают в низкотемпературный холодильник [Грачева, Осин, 2014; Малахаева и др., 2015; Каменских и др., 2010].

Исследования показали, что данный метод позволяет практически полностью сохранить жизнеспособность и неизменность морфологических признаков на протяжении 2-х лет хранения у тест-штаммов возбудителей туляремии и бруцеллеза (*Francisella tularensis*, *Brucella abortus*) [Малахаева и др., 2015]. В работе Петрикова К.В. с соавторами было показано, что для хранения биомассы микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* наиболее предпочтителен метод замораживания при  $-20^{\circ}\text{C}$  по сравнению с методом лиофилизации [Петриков и др., 2008]. Исследование выживаемости холерных вибрионов *Vibrio cholerae* при хранении в течение 3-х



лет при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  показало, что вибрионы могут быть сохранены в течение указанного периода без изменения основных диагностических признаков во всех протестированных защитных средах [Грачева, Осин, 2014]. Методом низкотемпературного замораживания хорошо хранятся представители рода *Haemophilus* [Votava, Stritecka, 2001]. Установлен высокий уровень жизнеспособности и сохранения основных морфологических и физиолого-биохимических характеристик при хранении при температуре  $-85^{\circ}\text{C}$  для коллекционных культур актинобактерий рода *Rhodococcus* [Каменских и др., 2010].

Низкотемпературная консервация по сравнению с другими методами хранения (лиофилизация и криоконсервация) микроорганизмов более универсальна в связи с наличием и доступностью низкотемпературных холодильников, способных надежно поддерживать низкие температуры в течение длительного времени. Кроме того, данный метод менее трудоемкий и безопасный по сравнению с криоконсервацией в жидком азоте [Малахаева и др., 2015].

Таким образом, для длительного хранения микроорганизмов используют три метода: криоконсервация в жидком азоте, лиофилизация и низкотемпературное замораживание. Однако ни один из этих методов не является универсальным. Несмотря на то, что к настоящему времени усовершенствованы оборудование и технологии хранения, определены основные факторы, влияющие на жизнеспособность клеток, выживаемость многих микроорганизмов остается низкой. Даже у хорошо исследованных микроорганизмов, которые устойчивы к длительному хранению, периодически возникают проблемы, связанные с потерей их ценных свойств. В связи с этим необходима не только оптимизация существующих методов, но и поиск новых подходов к переводу клеток в анабиотическое состояние.

### 1.3 Механизмы повреждений клеток в процессе консервации

При низкотемпературной консервации клетки подвергаются воздействию не только низких температур в диапазоне от  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $-196^{\circ}\text{C}$ , но и комплекса стрессовых физико-химических факторов, возникающих вследствие фазовых переходов воды, таких как образование кристаллов льда, высокие концентрации внутри и внеклеточных растворов, изменение рН среды, осмотические, концентрационные градиенты и др. [Грачева и др., 2011; Белоус, Грищенко, 1994; Williams, 1990; Бланков, Клебанов, 1961; Грачева, Осин, 2016; Simione, 1998, Chen et al., 2006; Dumont, 2006].

Проведенные исследования поврежденных клеток бактерий показали, что основными причинами гибели клеток при замораживании и оттаивании являются повреждения мембранных структур кристаллами внутриклеточного льда и вторичные повреждения, вызванные высокими концентрациями внутри и внеклеточных растворов. Вклад каждого из факторов в развитие криоповреждений зависит от типа клетки и скорости охлаждения клеточных суспензий. В настоящее время известны основные физико-химические факторы, вызывающие повреждение микроорганизмов при замораживании, но процессы, происходящие при разных условиях консервации в клетках, до конца не изучены [Грачева и др., 2011, Бланков, Клебанов, 1961; Белоус, Грищенко 1994; Грачева, Осин, 2016; Simione F.P. 1998, Chen et al., 2006; Dumont, 2006].

В физиологическом диапазоне температур биомембраны, сохраняя определенную структурную организацию, обладают жидкостностью, необходимой для функционирования, прежде всего, белковых компонентов, а также, вероятно, для обеспечения репарации спонтанно возникающих структурных дефектов. При температурах ниже физиологического диапазона компоненты биомембран «закристаллизовываются» в более жесткую, но и более хрупкую структуру. Такие мембраны нестабильны. У бактерий, в частности, это может проявляться в виде нарушений барьерных свойств

цитоплазматических мембран при резком охлаждении от физиологических температур до температур, близких к  $0^{\circ}\text{C}$ , без замораживания водной фазы. Это явление описано под названием «холодовой шок». Обращает на себя внимание то обстоятельство, что снижение температуры само по себе не только вызывает повреждение в мембранах, но, по-видимому, делает их более уязвимыми для других повреждающих факторов [Белоус, Грищенко 1994].

Начальное охлаждение клеток от комнатной температуры до  $0^{\circ}\text{C}$  приводит к снижению метаболизма, нарушению активного транспорта и работы ионных насосов. Обычно эти нарушения не являются причиной гибели клеток, если в культуральной среде поддерживается осмотический баланс [Ryan, 2004].

Кристаллизация водной фазы приводит к появлению целой совокупности факторов, повреждающих мембраны. Выраженность каждого из них зависит от условий замораживания – оттаивания. При небольших скоростях охлаждения клеточной суспензии кристаллизация воды происходит в первую очередь во внеклеточной среде, где концентрация растворенных веществ меньше, чем внутри клеток. По мере кристаллизации воды концентрация внеклеточного раствора повышается. Это приводит к частичной дегидратации клеток. Частичная дегидратация клеток и образование кристаллов льда приводит к сближению белковых молекул и образованию между ними дисульфидных связей путем окисления сульфгидрильных групп. При оттаивании межмолекулярные пространства белков увеличиваются, что приводит к разворачиванию молекул белка и их денатурации [Бекер, 1987; Грачева, Осин 2016, Simone, 1998, Ryan, 2004, Бланков, Клебанов, 1961].

При замораживании любого материала, содержащего воду и растворенные в ней соли, наблюдается эвтектическое разделение раствора. При постепенном замораживании суспензий клеток сначала замерзает свободная вода, в незамерзшей части воды начинают концентрироваться электролиты до тех пор, пока не будет достигнута эвтектическая температура, при которой наблюдается максимальная концентрация электролита. При достижении такой концентрации электролита дальнейшее понижение температуры ведет к

полному замерзанию всего раствора. Высокая концентрация электролитов может вызывать повреждения клеток и денатурацию белков в результате нарушения естественной структуры клеточных мембран при эвтектическом разделении раствора [Касьянов, Сязин, 2014].

Уменьшение объема клетки, повышение концентрации внутриклеточных солей, фазовые переходы мембранных липидов в ответ на холодовой осмотический шок могут привести к повреждениям белков, клеточных мембран и, как следствие, к гибели бактерий [Бекер, 1987; Грачева, Осин 2016; Simone, 1998; Ryan, 2004].

Исследования показали, что при низкой скорости охлаждения (примерно  $10^{\circ}\text{C}$  в минуту) большая часть клеток погибает на этапе замораживания от длительного воздействия холодового осмотического шока. Методами электронной криомикроскопии было показано, что при охлаждении клеточных суспензий до субнулевых температур между кристаллами льда формируются каналы со сконцентрированным замораживанием раствором и бактериальными клетками. По мере кристаллизации воды концентрация внеклеточного раствора повышается [Грачева, Осин, 2016; Dumont, 2006]. Однако для большинства бактерий и прокариот при медленных скоростях охлаждения, но достаточных для предотвращения дегидратации несложно определить «зону выживаемости» или «окно выживаемости», т.е. найти оптимальную скорость охлаждения, при которой клетки сохраняют жизнеспособность, что, практически, невозможно при замораживании – оттаивании эукариотических клеток без использования криопротекторов. Стоит отметить, что криопротекторы не оказывают существенного влияния на предотвращение повреждений, возникающих при медленном охлаждении. При высоких скоростях охлаждения влияние криопротектора значительно ниже [Ryan, 2004].

При больших скоростях охлаждения происходит внутриклеточная кристаллизация воды. Установлено, что этот процесс является одним из наиболее сильных повреждающих факторов для мембран. Предполагается, что внутриклеточный лед механически повреждает клеточные органеллы и

мембраны, что приводит к гибели клеток [Бекер, 1987; Simione, 1998; Ryan, 2004; Dumont, 2006]. В то же время, изучение динамики гибели бактерий при высоких скоростях охлаждения показало, что наиболее существенное снижение количества живых клеток происходит на этапе оттаивания вследствие механических повреждений мембран кристаллами внутриклеточного льда, либо осмотического стресса [Грачева, Осин, 2016].

В ходе исследования зависимости повреждения мембран от скоростей отогрева было обнаружено, что при медленном отогреве появляются дополнительные повреждающие факторы. Выраженность этих факторов была больше после высоких скоростей охлаждения. При таких режимах охлаждения-отогрева происходит рекристаллизация внутриклеточной воды, следствием которой является образование более крупных кристаллов внутри клетки [Бекер, 1987; Грачева, Осин, 2016; Dumont, 2006].

На примере *E.coli* было показано, что внешняя и цитоплазматическая мембраны имеют разную восприимчивость к одним и тем же повреждающим факторам. Внешние мембраны нечувствительны к «холодовому шоку», а также к повреждающим факторам внутриклеточного и внеклеточного льдообразования. В то же время цитоплазматические мембраны чувствительны к действию «холодового шока», а также к повреждающим факторам внутриклеточного и внеклеточного льдообразования. Можно предположить, что различный состав и мембран, а также особенности молекулярной организации оболочек в целом могут являться причиной их неодинаковой чувствительности к одним и тем же повреждающим факторам охлаждения – отогрева [Бекер, 1987].

При анализе влияния низкотемпературного воздействия на мембраны бактерий обращает на себя внимание тот факт, что повреждения всегда наблюдаются только у части клеток. Это может быть следствием существования определенной группы бактериальных клеток, обладающих повышенной устойчивостью к повреждающим факторам [Бекер, 1987].

При хранении микроорганизмов методом лиофилизации, также наблюдается гибель бактериальных клеток после дегидратации, которая может быть следствием денатурации белков, нуклеиновых кислот, изменением структуры мембранных липидов, клеточной стенки [Грачева, Осин, 2016].

Методом атомно-силовой микроскопии были обнаружены повреждения клеточной стенки *Lactobacillus helveticus* после высушивания [Santivarangkna et al., 2013]. Было отмечено изменение структуры белков у *E.coli* и *Bacillus subtilis* после высушивания [Leslie et al., 1995]. Однако основной мишенью повреждения клеток при дегидратации считаются клеточные мембраны. О повреждении клеточных мембран можно судить по высокой концентрации внеклеточных компонентов – ферментов, нуклеиновых кислот, электролитов во внеклеточном пространстве после регидратации сухих клеток. Одним из признаков повреждения мембран является повышенная чувствительность первых генераций бактерий к антибиотикам. Причиной таких явлений считается временное нарушение проницаемости мембран дегидратированных клеток, связанное с фазовыми переходами мембранных липидов [Грачева, Осин, 2016].

Мембранные липиды при физиологических условиях связаны с молекулами воды и находятся в жидкокристаллической фазе, с точки зрения кристаллографии биологические мембраны являются жидким кристаллом. Одним из важных условий выживания микроорганизмов является сбалансированность фазового состояния мембранных липидов [Киселев и др., 2010].

Изменения фазового состояния липидов наблюдаются при снижении температуры или уровня гидратации. Например, при высушивании полярные головки липидов сближаются, что приводит к усилению ван-дер-ваальсовых взаимодействий между соседними углеводородными цепями, снижению текучести мембраны и переходу мембранных липидов в фазу геля при комнатной температуре. При регидратации мембранные липиды подвергаются обратному переходу от геля к жидкокристаллической фазе. Фазовые переходы

мембранных липидов происходят не одновременно. Наличие липидов в разных фазах в течение длительного периода приводит к нарушению структуры и избирательной проницаемости мембран, что в условиях избытка воды, т.е. при регидратации, может приводить к потере жизненно важных компонентов: ионов, солей, белков, нуклеотидов и, как следствие, гибели бактерий [Crowe et al., 1989].

Экспериментально установлена тесная взаимосвязь ионного транспорта со структурным состоянием клеточной мембраны. Увеличение пассивной диффузии ионов при реактивации (регидратации) лиофилизированных клеток приводит к изменению соотношения ионов в клетке, вызывает изменение мембранного электрохимического потенциала [Бекер, 1987]. В результате могут возникать нарушения в энергетическом метаболизме клетки, ответственные за ход репарационных процессов. Развитие деструктивных процессов в клеточной мембране может быть усилено генерацией активных форм кислорода и развивающимся окислительным стрессом на этапе реактивации микроорганизмов. В процессе окисления в результате накопления продуктов перекисного окисления липидов, обладающих выраженными детергентными свойствами, может происходить дезорганизация липидного бислоя с последующим разрывом клеточной мембраны и гибелью клетки [Ипатова, 2005].

Окрашивание клеток бактерий рода *Lactobaccillus* после высушивания флуоресцентным красителем - пропидиумом иодитом, который проникает в клетки только через поврежденные мембраны, показало наличие поврежденных клеточных мембран [Тумчызун et al., 2007., Тумчызун et al., 2012].

Мембранные повреждения или структурные изменения мембран, которые происходят в результате длительного хранения, могут носить обратимый характер, если созданы оптимальные условия на всех стадиях процесса консервации [Бекер, 1987; Грачева, Осин, 2016; Филиппова, 2012].

Повреждения клеток могут наблюдаться и при хранении клеток микроорганизмов в виде сухих препаратов (при лиофилизации). Как

показывают исследования, на снижение количества жизнеспособных клеток влияют следующие условия: герметичность упаковки, остаточная влажность и вид микроорганизмов. Даже при оптимальных условиях хранения (герметично запаянные ампулы, температура хранения 2-4<sup>0</sup>С) количество живых клеток в препаратах постепенно снижается. Считается, что основной причиной повреждения бактериальных клеток при хранении являются реакции свободно-радикального окисления, которые приводят к повреждению белков, нуклеиновых кислот и липидов. Известно, что клетки микроорганизмов имеют эффективные механизмы защиты от свободных радикалов, но при хранении метаболизм клеток останавливается и клетка становится уязвимой [Грачева, Осин, 2016].

Методом электронного парамагнитного резонанса установлено наличие свободных радикалов в высушенных препаратах бактерий. Установлено повреждающее действие свободных радикалов на клеточные мембраны [Грачева, Осин, 2016].

В последнее время много исследований посвящено изучению механизмов устойчивости к низким температурам у психрофильных и мезофильных микроорганизмов, часть жизненного цикла которых проходит в условиях низких температур. Изучение белков, полисахаридов и др. веществ, выполняющих защитные функции у микроорганизмов, выделенных из экологических ниш Арктики и Антарктики, может стать основой для понимания процессов, происходящих в клетках при замерзании, а также для совершенствования методов низкотемпературной консервации [Chattopadhyay, 2002; Kim, Yim, 2007; Marx et al., 2009; Ewert, Deming, 2011].



### **1.4.1 Применение криопротекторов для защиты клеток микроорганизмов от повреждающих факторов**

Жизнеспособность микроорганизмов во время замораживания и хранения зависит от множества факторов: вида и штамма микроорганизма, размера клеток и их формы, состава клеточной стенки, температуры инкубации, аэрации, состава инкубационной среды и среды для хранения, скоростей охлаждения, хранения и оттаивания и т.д. Для снижения воздействия повреждающих факторов в процессе замораживания и хранения биологических структур применяются защитные вещества - криопротекторы. Известно, что микроорганизмы, способные к формированию спор, хорошо переносят замораживание без применения криопротекторов, но в большинстве случаев добавление криопротекторов существенно увеличивает выживаемость микроорганизмов [Бекер, 1987; Hubalek, 2003; Filippova et al., 2007].

Общими свойствами криопротекторов является наличие в их структуре полярных молекул, способных взаимодействовать как с молекулами  $H_2O$ , металлами и солями, так и с компонентами мембран и биополимерами. Важным свойством криопротекторов является также их способность влиять на процессы кристаллизации, способствуя формированию мелкокристаллического льда, который не обладает сильными полями напряжения. Изменение структуры льда под влиянием криопротекторов снижает степень механического воздействия на цитоплазматические структуры и мембраны. Поэтому вязкость криопротекторного раствора при низкой температуре должна быть высокой, чтобы при замораживании в микроканальцах, где концентрируются клетки, раствор переходил в аморфное состояние при относительно низких концентрациях криопротектора и солей. Таким образом, криопротекторы должны быстро проникать в клетку и легко удаляться из нее с тем, чтобы уменьшить осмотические эффекты при замораживании и отмывании криопротектора.

Криопротекторы должны отвечать следующим требованиям:

1. Сохранять жизнеспособность, морфологические, биохимические и генетические свойства микроорганизмов в процессе консервации и хранения.
2. Не обладать токсичностью.
3. Хорошо растворяться в воде.
4. Быть легко высушиваемыми.
5. Иметь низкую температуру эвтектики.
6. Предотвращать гиперконцентрирование солей в суспензии.
7. Хорошо проникать в клетки (при внутриклеточном механизме криопротекции) [Бекер, 1987; Грачева, Осин, 2016; Похиленко и др., 2009].

Классификация криопротекторов может быть основана на их молекулярном весе (низкомолекулярные и высокомолекулярные), но традиционно используется классификация, основанная на скорости проникновения криопротекторов в клетки [Hubalek, 2003].

Криопротекторы разделяют на внутриклеточные или проникающие, т.е это криопротекторы, которые проникают внутрь клетки (обычно время проникновения не превышает 30 минут) и внеклеточные (непроникающие). Проникающие криопротекторы препятствуют формированию кристаллов льда за счёт образования водородных связей с молекулами воды. Наиболее распространенные проникающие криопротекторы: пропиленгликоль, этиленгликоль, диметилсульфоксид, глицерин (скорость проникновения больше 30 минут) [Бекер, 1987; Похиленко и др., 2009; Hubalek, 2003].

К внеклеточным относят криопротекторы, не проникающие внутрь клеток. Принцип действия непроникающих криопротекторов до конца не ясен. Вероятно, защитное действие связано со снижением скорости роста кристаллов и защитой клетки от осмотических перепадов. К непроникающим криопротекторам относят две группы веществ: моно-, олиго-, полисахариды (наиболее часто используют сахарозу и трегалозу), маннитол, сорбитол и высокомолекулярные соединения (наиболее часто используют фиколл, альбумин, поливинилпирролидон) [Бекер, 1987; Похиленко и др., 2009; Hubalek, 2003].

Глицерин (1,2,3 пропантриол) успешно применяется для низкотемпературной консервации бактерий. Механизм защитного действия глицерина объясняется его адсорбцией на клеточной мембране и интеркалляцией между молекулами липидов, способствующих лабильности мембран [Каменских и др., 2010]. Чаще всего данный криопротектор используют в концентрациях 2-25% в составе водных растворов, жидких питательных сред, а также в сочетании с другими криозащитными веществами. Глицерин широко используется для консервации разнообразных вирусов, бактерий, риккетсий, микоплазм, миксомицетов, мицелиальных грибов, дрожжей, водорослей, и протист [Грачева и др., 2011; Похиленко и др., 2009; Hubalek, 2003]. Хранение *E. coli* с рекомбинантными плазмидами в 10% глицерине обеспечило практически 100% выживаемость штаммов в течение 11 лет и сохранение в популяции большинства штаммов структурно неповрежденных плазмид [Koenig, 2003]. Исследования показали, что применение раствора глицерина при хранении *Theileria parva*, *Leptospira interrogans*, *Tetraselmis suecica* более предпочтительно нежели использование ДМСО [Hubalek, 2003]. По данным Каменских Т.Н. с соавторами криоконсервация алканотрофных актинобактерий *Rhodococcus erythropolis* с использованием 10% глицерина показало высокий уровень выживаемости (80%) в течение всего срока хранения (один год). При этом показатель жизнеспособности отдельных штаммов *Rhodococcus erythropolis* достигал 94% [Каменских и др., 2010]. В то же время, глицерин не оказывает защитного действия при хранении бактерий родов *Methylomonas*, *Methylococcus*, *Methylocystis*, *Spirillum*, *Anaplasma* [Hubalek, 2003].

Диметилсульфоксид (ДМСО, Me<sub>2</sub>SO) – второй по частоте использования компонент защитных сред. Следует отметить, что он более токсичен, чем глицерин. В тоже время ДМСО обладает большими проникающими способностями и его часто используют для более сложных организмов, таких как протисты. Однако некоторые бактерии (*Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, и *Sreptomycetes*) толерантны к высоким дозам ДМСО [Грачева и др., 2011; Похиленко и др., 2009; Simione, 1998].

Изначально ДМСО использовался для криоконсервации эритроцитов и сперматозоидов. В настоящее время он широко применяется для хранения вирусов, бактерий, включая риккетсии, микоплазм, хламидий, цианобактерий, грибов, водорослей, и простейших. Только химически очищенный ДМСО может быть использован в качестве криопротектора. Концентрации ДМСО широко варьируют от 1 до 32 %. Например, для криоконсервации *Anaplasma marginale* концентрация ДМСО в среде хранения должна составлять 32%. В большинстве случаев используют 5-15% ДМСО в составе водных растворов или питательных сред [Грачева и др., 2011; Похиленко и др., 2009; Hubalek, 2003; Ryan, 2004; Simione, 1998].

Для хранения бактерий часто используют вещества из группы углеводов: глюкозу, трегалозу, лактозу, сахарозу в концентрациях 5-15% [Грачева и др., 2011]. Глюкоза используется в криомикробиологии в концентрациях 1-18%. Она является эффективным криопротектором для фага T4, *Anaplasma marginale* (в сочетании с сахарозой), дрожжей, спор *Puccinia* и др. [Hubalek, 2003].

Считается, что углеводы обладают менее выраженными криозащитными свойствами, чем глицерин или ДМСО, поэтому их рекомендуют применять в сочетании с другими протекторами, например, некоторые криочувствительные штаммы грибов (*Phytophthora palmivora*, *Entomophthora exitialis*, *Pythium sylvaticum*, *Pseudophaeolus baudonii*) замораживают в смеси 8% глюкозы и 10% ДМСО. Применение смеси 5% лактозы и 10% глицерина для криоконсервации *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aureofaciens* и *Streptomyces tenebrarius* привело к лучшим результатам, чем использование глицерина без добавления глюкозы [Грачева и др., 2011; Грачева, Осин, 2016; Hubalek, 2003;]. Однако было показано, что защитное действие сахарозы, применяемой для криоконсервации *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis* сопоставимо с защитным действием глицерина и ДМСО [Высеканцев и др., 1992; Грачева и др., 2011].

Много исследований посвящено изучению защитных свойств низкомолекулярных углеводов, которые используются в качестве

криопротекторов при высушивании бактерий. Углеводы стабилизируют структуру белков и понижают температуры фазовых переходов мембранных липидов. Предполагается, что углеводы образуют водородные связи с полярно-заряженными группами белков, стабилизируя их структуру в отсутствии воды. Было установлено, что защитные свойства дисахаридов выше, чем моносахаридов [Crowe et al., 1989; Morgan et al., 2006]. Кроме того, есть данные, что защитные свойства дисахаридов возрастают в ряду лактоза – сахароза – трегалоза [Costa et al., 2000; Kurtmann et al., 2009; Pehkonen et al., 2008].

Дисахариды также используются в качестве криопротекторов и при замораживании микроорганизмов. Присутствие углеводов во внеклеточных растворах вызывает обезвоживание клеток до замораживания, снижая вероятность образования внутриклеточного льда. Кроме того, углеводы понижают температуру замораживания растворов, предохраняя клетки от вредного воздействия высоких концентраций солей [Грачева, Осин, 2016].

Сахароза довольно часто используется для криоконсервации микроорганизмов и вирусов в концентрациях 1-68% (чаще всего 10%). Успешно хранятся при добавлении сахарозы микроорганизмы *E.coli*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Clamydia* spp. и др. Было показано, что выживаемость штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* в 5% растворе сахарозы больше, чем при использовании 10% раствора глицерина [Hubalek, 2003].

Кроме описанных выше углеводов, для хранения микроорганизмов используют мальтозу, рафинозу, декстран, инулин, метилцеллюлозу, фиколл и др. полисахариды. Исследования показали, что выживаемость штаммов *Micrococcus luteus* и *Staphylococcus epidermidis* при хранении в 1% растворе метилцеллюлозы выше, чем при хранении в 15% глицерине [Hubalek, 2003].

Ацетамид, диметилацетамид, диметилформамид в концентрациях 10% проявляют высокие защитные свойства, сравнимые с глицерином и ДМСО при замораживании и хранении *Enterobacter aerogenes*. Показана высокая выживаемость молочнокислых стрептококков при замораживании с применением 0,5% или 2% раствора ацетамида и обезжиренного молока [Hubalek, 2003].

Поливинилпирролидон (PVP) часто используется как в криобиологии, так и в микрокриобиологии в концентрациях 2-20%. Существует несколько гипотез о механизмах криопротекции данного вещества. В одной из них рассматривается механизм пиноцитоза, другая гипотеза предполагает, что поливинилпирролидон связывается с полимером клеточной мембраны и формирует внешнюю защитную оболочку [Похиленко и др., 2009]. Поливинилпирролидон является хорошим криопротектором для грамотрицательных анаэробных микроорганизмов *Fusobacterium nucleatum* и *Selenomonas sputigena* [Gilmour et al., 1978], метанотрофных бактерий родов *Methylobacter*, *Methylococcus* и *Methylocystis* [Green, Woodford, 1992]. Применение поливинилпирролидона в концентрациях 7,5 - 20% в качестве единственного криопротектора или совместно с 7,5% фикоλλом весьма эффективно при криоконсервации *Anaplasma* spp. [Standfast, Jorgensen, 1997]. Поливинилпирролидон успешно используются при криоконсервации водорослей и простейших [Hubalek, 2003].

Глутаминовая кислота в качестве криопротектора применяется в концентрациях 1-5% и обычно используется добавлением других защитных компонентов таких как, глицерин или обезжиренное молоко для криоконсервации водорослей родов *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum* [Hubalek, 2003].

L-пролин – природный криопротектор применяется для хранения цианобактерий *Spirulina platensis* и водорослей *Enteromorpha intestinalis* и *Enteromorpha bicyclis* [Hubalek, 2003].

Пептиды, протеины, гликопротеины широко применяются для консервации вирусов, бактерий, цианобактерий, хламидий, микоплазм, дрожжей, и простейших [Hubalek, 2003].

Сывороточный альбумин в течение долгого времени применялся только для консервации вирусов и риккетсий в концентрациях 0,1-4%. В настоящее время сывороточные альбумины применяются для широкого круга микроорганизмов. Их также используют в комбинациях с другими криопротекторами. Было показано, что использование 0,5% БСА (бычий сывороточный альбумин) для

хранения возбудителя лептоспироза *Leptospira interrogans* имело больший успех, чем в присутствии 5% ДМСО, но было менее эффективно в присутствии 10% глицерина. Высокая выживаемость отмечена при хранении цианобактерий *Spirulina.platensis* с применением яичного альбумина, БСА, гидролизата казеина и желатина. Сывороточный альбумин хорошо подходит для консервации *E.coli* и *Micobacterium leprae*. Альбумины часто используют для криоконсервации микроорганизмов, чувствительных к глицерину, ДМСО или другим криопротекторам [Hubalek, 2003].

Природные протеины и гликопротеины, выделенные из растений, рыб, насекомых, микроорганизмов способны защищать организмы от криповреждений. В настоящее время они малоизучены и редко используются в практике. Например, внеклеточные гликопротеины, выделяемые *Rhodospiridium toruloides* и *Lipomyces starkeyi*, состоящие из маннозы, глюкозы и белка при добавлении к 10% глицерину или ДМСО способны повышать жизнеспособность некоторых штаммов дрожжей, замороженных в жидком азоте [Breierova, Kockova-Kratochvilova, 1992].

Полипептидные антибиотики грамицидин и валиномицин повышают криорезистентность *E.coli* при медленном охлаждении и оттаивании в присутствии ЭДТА [Hubalek, 2003].

Дрожжевой экстракт в концентрациях 0,25-5% используется для консервации молочнокислых бактерий, дрожжей и простейших. Солодовый экстракт в концентрациях 0,5-20% показал хорошие результаты при хранении молочнокислых бактерий в жидком азоте. Он также используется для хранения дрожжей и нитчатых грибов [Hubalek, 2003].

Обезжиренное молоко используется не только для криоконсервации, но и для лиофилизации микроорганизмов, часто в комбинациях с другими криопротекторами. *Mycobacterium tuberculosis*, суспендированный в обезжиренном молоке, сохраняет 100% жизнеспособность на протяжении 1 года хранения при -70<sup>0</sup>С [Hubalek, 2003]. Была показана высокая выживаемость культур *Photobacterium phosphoreum* при хранении методом лиофилизации с

применением обезжиренного молока в качестве криопротектора [Tran et al., 2007]. Исследования показали, что выживаемость культур *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Borrelia burgdorferi*, *Salmonella enterica* subsp. *typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* при длительном хранении при температуре - 80<sup>0</sup>С с использованием 10% обезжиренного молока была выше, чем при использовании 15% глицерина [Cody et al., 2008].

Полимерные криопротекторы образуют с молекулами воды, входящими в координационную сферу макромолекулы, связи и этим самым значительно повышают вязкость микроокружения. При этом в водной среде происходит формирование мицеллярных структур, которые разворачиваются, и сольватация такой системы увеличивается, а вязкость жидкой фазы повышается. В силу этого, а также в результате непосредственного взаимодействия реакционноспособных групп белков и молекул связанной H<sub>2</sub>O, структура биомолекул стабилизируется [Бекер, 1987].

Сульфактанты: Tween 80 (полисорбат, моноолеат, неионогенное ПАВ), Triton WR-1339 (полимерный алкиларилполиэфирспирт), Macrocyclon (ПЭГ, октилфенолформамид) являются протекторами для *E.coli*, *Enterobacter.aerogenes* и *B.subtilis*, предотвращают повреждения при замораживании аналогично глицерину [Hubalek, 2003].

Наличие спорообразующих бактерий в ледниках является общепризнанным фактом. Исследования показали, что бактериальные споры способны восстанавливать жизнедеятельность после длительного пребывания в состоянии анабиоза. Сроки пребывания в состоянии анабиоза оцениваются исследователями от сотен тысяч до миллионов лет [Абызов, 1992; Звягинцев и др., 1985; Звягинцев, 1992; Gilichinsky, Wagener, 1994; Комолова и др., 2017; Кудряшова, 2017]. При этом температурный диапазон роста данных культур микроорганизмов в лабораторных условиях находится от +4<sup>0</sup>С до +50<sup>0</sup>С. Кроме спорообразующих микроорганизмов микробные комплексы мерзлотных почв включают не спорообразующие микроорганизмы и прокариотические организмы: дрожжи и мицелиальные грибы [Комолова и др., 2017; Кудряшова и др., 2017, Абызов,



1992]. До сих пор способ выживания микроорганизмов в мерзлоте в течение длительно периода до конца не выяснен [Gilichinsky & Wagner, 1994]. Проведенные исследования всех групп микроорганизмов, выделенных из ледника Антарктиды, выявили способность выделенных микроорганизмов к синтезу меланиноподобных пигментов, что, вероятно, связано с защитными функциями организма в экстремальных условиях [Абызов, 1992]. Актиномицеты также являются неотъемлемой частью мерзлотных микробиомов [Комолова и др., 2017; Кудряшова и др., 2017, Абызов, 1992].

В настоящее время продолжается поиск, создание и изучение искусственных и естественных криопротекторов, используемых для замораживания и длительного хранения организмов. Продолжаются исследования, основной целью которых является изучение взаимосвязи физико-химических свойств, криозащитного действия и токсичности криозащитных веществ. Решение этих вопросов позволит разработать научно обоснованные подходы к направленному синтезу криопротекторов и созданию на их основе многокомпонентных криоконсервантов, обладающих хорошими защитными свойствами, не токсичных и не требующих отмывания [Белоус, Грищенко, 1994; Грачева и др., 2011].

### **1.5 Методы исследования липидного бислоя и структурной организации мембран**

Повреждение мембранных структур в процессе замораживания, хранения и реактивации - основная причина гибели микроорганизмов [Бланков, Клебанов, 1961; Белоус, Грищенко 1994; Грачева и др., 2011, Грачева, Осин, 2016; Нардид, 2014; Chen et al., 2006; Dumont, 2006; Simione F.P. 1998; Williams, 1990].

Структурные исследования липидных наносистем открывают новые возможности для изучения молекулярных механизмов функционирования клеточных мембран.

Основой всех биологических мембран являются полярные липиды, которые формируют жидкокристаллический бислой. Его непрерывность определяет барьерные и механические свойства клетки [Антонов В.Ф., 1998]. Многообразие липидных структур заложено в фазовых диаграммах полярных липидов и экспериментально обнаруживается при фазовых переходах. Наиболее изучены переходы из жидкокристаллического состояния в гель ( $L\alpha \rightarrow L\beta$ ). При этом переходе жидкость мембраны меняется, но сохраняется ее бислойная структура. В то же время фазовые переходы из жидкокристаллического состояния в гексагональную ( $L\alpha \rightarrow \text{HII}$ ) или кубическую ( $L\alpha \rightarrow Q\alpha$ ) фазу, напротив, сохраняя жидкость мембраны, сопровождаются утерей бислойности в изолированных условиях [Антонов В.Ф., 1998].

Радиоспектрометрические методы позволяют анализировать структуру, фазовое состояние и молекулярную динамику образцов в зоне отрицательных температур. Резонансные методы подразделяют на метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [Волков и др., 1985].

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) позволяет определять локализацию молекул в мембране и строить функции распределения различных веществ в липидном бислое [Holte, Gawrish, 1997]. Метод основан на резонансном поглощении в сильном внешнем магнитном поле энергии электромагнитного радиочастотного поля системой атомных ядер, обладающих магнитным моментом. Данный метод был с успехом применен в исследованиях, как индивидуальных липидов, так и модельных биологических мембран [Крепс, 1981].

Метод ЭПР основан на введении в липидный бислой парамагнитных меток и зондов. В качестве спиновых меток и зондов составляет стабильный свободный иминоксильный (нитроксильный) радикал с неспаренным электроном. Если производное такого радикала присоединяется к белку или липиду ковалентной связью, то такое производное называют спиновой меткой, а если с помощью электростатических сил и гидрофобных взаимодействий - спиновым зондом.

Недостаток метода заключается в том, что введение зонда меняет структуру бислоя и свойства мембраны [Крепс, 1981]. Использование данного метода позволило оценить влияние гиперконцентрации солевых растворов на структуру клеточных мембран при различных режимах замораживания и различных составах среды замораживания [Нардид, 2014].

Метод электронной микроскопии позволяет исследовать морфологию мембраны, распределение фаз в мембране, трехмерную структуру белков, их форму и размеры. Но из-за обезвоживания мембраны, фиксации и контрастирования солями тяжелых металлов происходит существенная модификация структурного состояния компонентов мембран. Разновидностью данного метода являются методы замораживания-скалывания и замораживания – травления. Данные методы позволяют изучить характер взаимного расположения белковых и липидных компонентов. Образцы замораживают в жидком азоте, затем раскалывают в плоскости наименьшего сопротивления в вакууме, затем поверхность образца покрывают платиной и углеродом, растворяют и реплику рассматривают в электронный микроскоп [Крепс, 1981].

Метод флуоресцентных меток или зондов основан на поглощении веществом энергии возбуждения, т.е. перехода частиц вещество из основного состояния в возбужденное и обратно. Флуоресцентные методы позволяют исследовать структуры липидных и биологических мембран [Лакович, 1986].

Дифференциальная сканирующая калориметрия основана на регистрации тепловых процессов, связанных с фазовыми переходами липидов, которые вызваны температурными сдвигами. Широко применяется при изучении термотропного поведения липидов в природных мембранах и модельных системах [Крепс, 1981].

С помощью изотермической титрационной калориметрии можно исследовать лиотропные фазовые переходы и получать термодинамические параметры в смешанных системах липид/детергент, что важно для исследования процесса растворения - самосборки липидной мембраны в реконструкции мембранных белков [Kirchhoff, Levin, 1987].

Инфракрасная спектроскопия фиксирует изменения интенсивности различных связей в липидных молекулах при воздействии на них других веществ или изменения физико-химических параметров, что позволяет исследовать структуру и свойства липидных систем [Shashkov et al., 1999].

Дифракционные методы (рентгеновская дифракция и дифракция нейтронов) основаны на взаимодействии электромагнитного излучения или частиц с длиной волны, соизмеримой с межато́мным расстоянием, и компонентов мембраны. Их используют для определения наноструктуры липидной мембраны, липидных мицелл и сложных фаз (кубической и гексагональной), толщины бислоя, среднего расстояния между углеводородными цепями [Hallet et al., 1991].

Для определения структуры липидного бислоя, размеры которого составляют около 50 Å, наиболее эффективными являются методы рассеяния нейтронов с длиной волны от 1 до 10 Å (тепловые и холодные нейтроны) и рассеяние синхротронного рентгеновского излучения с длиной волны от 1 до 2 Å. [Киселев, 2011].

Дифракционные методы неэффективны для определения микроскопических параметров липидных систем, например, липосом. В этом случае рекомендуется применять статистическое и динамическое рассеяние света. Комбинированное применение статистического и динамического рассеяния света широко в бионанотехнологии при разработке технологии изготовления переносчиков лекарств [Hallet et al., 1991].

Таким образом, к настоящему времени разработан целый ряд высокочувствительных методов исследования биологических и модельных мембран. Данные методы позволяют получить сведения о строении и конфигурации липидных молекул, об их взаимодействии друг с другом и с молекулами белков, исследовать фазовые переходы и другие параметры мембран.

## Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

Для выделения актиномицетов использовали образцы дерново-подзолистой почвы (образец №1, отобранный в г. Москве) и чернозема (образец №2, отобранный в Оренбургской области). Образцы почвы были отобраны в летний период из верхних горизонтов почвы (горизонт А).

Для изучения влияния низкотемпературного замораживания на жизнеспособность и антибиотическую активность актиномицетов были отобраны культуры актиномицетов, выделенные из образцов почвы №1 и №2.

Для изучения фазово-структурного состояния фосфолипидных фракций были отобраны следующие актиномицеты из коллекции ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе»: *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *Nonomuraea roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06.

### 2.2 Селективное выделение актиномицетов из почвы с добавлением сока алоэ древовидного

Срезанные листья алоэ древовидного (*Alóe arboréscens*) помещали в темное место при температуре +4<sup>0</sup>С на 10 дней. Листья обрабатывали 70% этиловым спиртом и разрезали на мелкие куски размером 1 см, затем отжимали сок через стерильную марлю. Свежевыжатый сок пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Полученный фильтрат добавляли в пробирку с дистиллированной стерильной водой, конечная концентрация сока алоэ составляла 10% и 50 %. Приготовление почвенных суспензий: 100 мг почвы тщательно растирали в фарфоровой ступке, затем помещали в пробирку с 10

миллилитрами стерильной дистиллированной воды, встряхивали на вортексе в течение 5 минут, отстаивали 30 секунд и отбирали для дальнейшего разведения 1 мл суспензии. Далее 1 мл суспензии помещали в пробирку с 9 мл смеси стерильной воды и сока алоэ. В контроль сок алоэ не добавляли. Пробирки с почвенными суспензиями настаивали в течение 10 минут или 1 часа. Высев производили стандартным методом поверхностного посева на питательные среды: овсяный агар и органический агар №2 Гаузе [Гаузе и др., 1983]. На чашку Петри с агаровой средой наносили по 50 мкл суспензии. Инкубировали в термостате при температуре 28<sup>0</sup>С в течение 14 дней.

### 2.3 Состав питательных сред

Для поверхностного культивирования применяли твердые питательные среды следующего состава:

1. Органическая среда 2 Гаузе (модификация\*): триптон - 3,0 г, пептон - 5,0 г, глюкоза - 10,0 г, NaCl - 5,0 г, агар – 20,0 г, вода 1000 мл; pH=7,2 – 7,4.
2. Овсяный агар: овсяная мука - 20,0 г, вода – 1000 мл, агар – 20,0 г; pH=7,2 – 7,4.

Для глубинного культивирования применяли среды:

1. Жидкая органическая среда №2 Гаузе (модификация\*): триптон - 3,0 г, пептон - 5,0 г, глюкоза - 10,0 г, NaCl - 5,0 г, вода 1000 мл; pH=7,2-7,4
2. Жидкая органическая среда №2 Гаузе с мелом: триптон - 3,0 г, пептон - 5,0 г, глюкоза - 10,0 г, NaCl - 5,0 г, CaCO<sub>3</sub> – 2,5, г вода 1000 мл; pH=7,2-7,4
3. Среда 6613: KNO<sub>3</sub> – 4,0 г, CaCO<sub>3</sub> – 5,0 г, NaCl – 0,5 г, крахмал – 20,0 г, дрожжевой экстракт 2,5 г, вода – 1000 мл; pH=7,0.
4. Среда 330: крахмал – 20,0 г, горох – 0,5 г, сахароза – 0,5г, NaNO<sub>3</sub> – 5,0 г, CaCO<sub>3</sub> – 5,0 г, NaCl – 0,5 г, вода – 1000 мл; pH=7,0.

5. Среда «сахарозная»: сахароза – 20,0 г, соя - 10,0 г, KNO<sub>3</sub> – 2,0 г, NaCl – 3,0 г, CaCO<sub>3</sub> – 3,0 г, вода – 1000 мл; pH=7,0.
6. Среда 2663: соя – 15,0 г, глицерин – 30,0 г, NaCl – 2,0 г, CaCO<sub>3</sub> – 5,0 г, вода – 1000 мл; pH=7,0.
7. Среда А4: соя – 10,0 г, глюкоза – 10,0 г, NaCl – 5,0 г, CaCO<sub>3</sub> – 2,5 г, вода – 1000 мл; pH=7,2 – 7,4.
8. Среда 5339: соя – 5,0 г, глицерин – 20,0 г, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1,5 г, NaCl – 3,0 г, CaCO<sub>3</sub> – 2,0 г, вода – 1000 мл; pH=6,8.

\* В модифицированной среде используют триптон вместо бульона Хоттингера в количестве, эквивалентном по содержанию азота.

#### **2.4 Количественный учет актиномицетов и статистическая обработка результатов исследований.**

Количество актиномицетов в 1 г почвы определяли по числу колоний, выросших на твердой питательной среде. Далее колонии выделяли в чистую культуру и определяли систематическое положение выделенных культур.

Для оценки численности актиномицетов в почве и обработки данных, полученных при хранении актиномицетов, использовали методы математической статистики, рассчитывая среднее значение, стандартное отклонение и доверительный интервал. Доверительную вероятность принимали равной 0,95 [Платонов, 2000].

$$x_{\text{cp}} = 1/n(x_1 + \dots + x_i)$$

$x_{\text{cp}}$  - среднее арифметическое

$n$  - количество чашек Петри, на которых подсчитывали колонии

$x$  – количество колоний актиномицетов на одной чашке Петри

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{\text{cp}})^2}{n - 1}}$$

S – стандартное отклонение

Статистическую обработку данных проводили в программе Excel 2010 (Microsoft Inc., 2011).

## 2.5 Изучение таксономического положения выделенных культур

Колонии, выросшие на чашках Петри, выделяли в чистую культуру в пробирки со скошенными агаровыми средами: овсяным агаром и органическим агаром №2 Гаузе [Гаузе и др., 1983]. Далее проводили изучение фенотипических признаков: культуры, выращенные на овсяном агаре, просматривали в микроскоп OLIMPUS BX-41 при увеличении  $\times 200$ ,  $\times 400$ ,  $\times 1000$ , культуральные признаки определяли по окраске воздушного и субстратного мицелия.

Анализ изомеров диаминопимелиновой кислоты (ДАПК) и анализ дифференцирующих сахаров в гидролизатах клеток определяли с помощью методов восходящей тонкослойной хроматографии в целлюлозном слое [Lechevalier et al., 1971]. Для этого в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 150 мл жидкой органической среды №2 Гаузе, наращивали биомассу культур актиномицетов. Культивирование проводили на качалках со скоростью 180 об/мин при температуре  $28^{\circ}\text{C}$ , время роста культур составляло 5-14 суток. Мицелий отделяли центрифугированием при 4000 об/мин (центрифуга Eppendorf 5702, Германия), затем промывали дистиллированной водой, центрифугировали при тех же оборотах, промывали 70% этанолом и снова центрифугировали при 4000 об/мин, после чего мицелий высушивали при  $28^{\circ}\text{C}$ . Для проведения гидролиза применяли модифицированный метод [Ли, 2003]: 1 мг сухого мицелия растирали в фарфоровой ступке, помещали в ампулу с 10 мкл 6N HCL и запаивали. Ампулу помещали в термостат при температуре  $105^{\circ}\text{C}$  на 18 часов. После охлаждения 1 мкл гидролизата наносили на целлюлозную пластинку «Merk», в качестве контроля использовали 0,01M раствор ДАПК, который содержал LL- и мезо-ДАПК. Восходящая хроматография проходила в системе



растворителей метанол: дистиллированная вода: 6N HCL: пиридин (80:26:4:10) в течение 3 – 5 часов. После высушивания хроматограмму обрабатывали раствором нингидрина («Acros») и нагревали в течение двух минут при температуре 100<sup>0</sup>С для проявления пятен. Пятна обеих конфигураций имели оливково-зеленый цвет, быстро желтели на воздухе. Другие аминокислоты имели фиолетовый цвет и двигались быстрее, чем ДАПК. Пятна мезо-ДАПК располагались ближе к старту, так как Rf у мезо-ДАПК меньше, чем у LL-ДАПК. В некоторых пробах проявлялись пятна ОН-изомера ДАПК, Rf которого меньше, чем у мезо-ДАПК.

Для определения дифференцирующих сахаров в гидролизатах клеток 5 мг сухого мицелия помещали в ампулу с 100 мкл 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ампулу запаивали. В течение 1 часа проводили гидролиз мицелия на кипящей водяной бане. Затем ампулы вскрывали, к гидролизату добавляли насыщенный раствор Ва(ОН)<sub>2</sub> и доводили рН до 5,0 – 5,5. Осадок отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 минут. К надосадочной жидкости добавляли 500 мкл хлороформа и упаривали при температуре 37<sup>0</sup>С. Сухой остаток растворяли в 40 мкл дистиллированной воды, на пластинку «Merk» наносили 2 мкл гидролизата. В качестве контроля использовали смеси сахаров: галактозы, глюкозы, маннозы, арабинозы, ксилозы, рамнозы. Разделение проводили в системе: бензол: бутанол: пиридин: вода (10:50:30:30) [Gaillard, 1953]. Для проявления хроматограммы использовали кислый анилин-фталат фирмы «Fluka». Затем хроматограмму нагревали при температуре 100<sup>0</sup>С в течение 3 – 4 минут. На хроматограмме сахара располагались в следующем порядке: галактоза, глюкоза, манноза, арабиноза, ксилоза, рамноза. Пятна гексоз на хроматограмме имели бурую окраску, пятна пентоз – красную.

Используя полученные данные о составе клеточных стенок, определяли родовую принадлежность культур по определителю Берджи [Определитель бактерий Берджи, 1997] и материалам сравнения состава клеточных стенок у актинобактерий [Yamaguchi, 1965].

Для изучения геносистематических признаков проводили сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК.

Выделение ДНК проводили согласно методике Манучаровой Н.А. [Манучарова, 2010], используя набор для выделения Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, США). Актиномицеты выращивали на жидкой органической среде 2 Гаузе в колбах Эрленмейера объемом 750мл. Культивирование проводили на качалках со скоростью 180 об/мин при температуре 28<sup>0</sup>С, объем жидкой среды в колбах 150 мл, время роста культур 5-14 суток. Мицелий отделяли центрифугированием при 4000 об/мин в центрифуге Eppendorf 5702 (Германия).

Для проведения полимеразной цепной реакции использовали праймеры: 27f (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') и 1492r (5' – TACGGYTACCTTGTTACGACTT – 3') фирмы «СИНТОЛ» (Россия), Амплификацию проводили на автоматическом амплификаторе 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) в режиме: иницирующая денатурация 94<sup>0</sup>С – 4 минуты, 30 циклов: 94<sup>0</sup>С – 1 минута, 51<sup>0</sup>С – 1 минута, 72<sup>0</sup>С – 2 минуты, финальная элонгация при 72<sup>0</sup>С – 10 минут. Для ПЦР-амплификации использовали набор реагентов фирмы «Thermo Fisher Scientific» (США).

Очистку амплифицированной ДНК от праймеров и других компонентов ПЦР-реакции проводили методом прямого пересаживания ДНК в мягких условиях (<http://www.genome-centre.ru/info.html>). Осадок высушивали при температуре 65<sup>0</sup>С. Сухой остаток ресуспендировали в 10 мкл деионизированной воды MQ.

Очищенные продукты амплификации подвергали горизонтальному электрофорезу в 1% агарозном геле при напряженности электрического поля 120 В/см, силе тока 33 мА/см. В качестве электрофоретического буфера использовали Трис-боратный электродный буфер 10×ТВЕ (890 мМ Трис, 890 мМ борная кислота, 20 мМ ЭДТА, рН 8,3) фирмы «Thermo Fisher Scientific» (США) с добавлением этидиума бромиды (Helicon, Россия). Для нанесения образцов ДНК на гель применяли раствор с красителями фирмы «Fermentas» (6X): 10 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 0,03% бромфеноловый синий, 0,03% ксиленцианол FF, 60% глицерин, 60 мМ ЭДТА. После электрофоретического разделения полосы ДНК просматривали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Для определения нуклеотидной последовательности использовали праймеры: 27f (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'), 341f – gcd (5' – CCTACGGGAGGCAGCAG – 3'), 785f (5' – GGMTTAGATACCTGGTAGTCC – 3'), 1492r (5' – TACGGYTACSTTGTACGACTT – 3') фирмы «СИНТОЛ» (Россия). Реакцию секвенирования проводили на автоматическом амплификаторе 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) в следующем температурно-временном режиме: иницирующая денатурация 96<sup>0</sup>С – 1 минута, 25 циклов при 96<sup>0</sup>С – 10 секунд, 50<sup>0</sup>С – 5 секунд, 60<sup>0</sup>С – 4 минуты. По окончании процесса образцы очищали методом прямого переосаждения ДНК в мягких условиях (<http://www.genome-centre.ru/info.html>). Высушенный осадок ресуспендировали в 20 мкл Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, США), полученный раствор переносили в ячейки плашки. Секвенирование проводили на автоматическом капиллярном секвенаторе 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США) с использованием реагентов BigDye Terminator v3 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), в соответствии с рекомендациями производителя.

Идентификацию актиномицетов осуществляли методом сравнения нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагментов генов 16S рРНК с последовательностями, представленными в базе данных GenBank NCBI по протоколу nBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>). Редактирование последовательностей проводили в редакторе BioEdit, множественное выравнивание и построение филогенетических деревьев с использованием программы MEGA 6.

## 2.6 Выделение фосфолипидных фракций из мембран актиномицетов

Для получения биомассы актиномицеты (*Nonomuraea roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06 и *Streptomyces hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>) выращивали на жидкой органической среде №2 Гаузе в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 150 мл жидкой среды

Культивирование проводили на качалках со скоростью 180 об/мин при температуре 28<sup>0</sup>С, время роста культур составляло культур 4-5 суток. Мицелий осаждали центрифугированием при 4000 об/мин (центрифуга Eppendorf 5702, Германия), затем промывали буферным раствором, содержащим 20мМ трис-НСl и 2мМ ЭДТА, рН=7,0. В качестве лизирующего агента использовали лизоцим марки Б (Реахим, Россия) в концентрации 4-5 мг/мл. Для разрушения белков использовали проназу 250 мкг/мл (Синтол, Россия), затем добавляли ДНКазу и РНКазу (Синтол, Россия) в концентрации 10 мкг/мл. Мембранную фракцию получали центрифугированием при 22000 об/мин в течение 30 минут на центрифуге Beckman (США). Чистоту препаратов мембранных фракций проверяли при помощи фазово-контрастной и электронной микроскопии (JEM 100СХП, JEOL, Япония). Липидную фракцию выделяли, используя методику О'Доннелла с соавторами [O'Donnell et al., 1985]: осажденный при 4000 об/мин мицелий высушивали в термостате при температуре 37<sup>0</sup>С, растирали в фарфоровой ступке до порошкообразной массы, помещали 100 мг мицелия в колбу с притертой крышкой. К мицелию добавляли 2,5 мл смеси хлороформ: метанол: 0,3% NaCl в следующих соотношениях 9:10:3 колбу ставили на качалку (180 об/мин) на 1 час. После перемешивания отделяли мицелий через бумажный фильтр (синяя лента, НеваРеактив, Россия). Отделенный мицелий заливали смесью хлороформ : метанол : вода (5:10:4) в количестве 0,75 мл и ставили на качалку при тех же условия на 30 минут. Мицелий снова отфильтровывали, соединяли полученные экстракты и добавляли 1,3 мл смеси хлороформ: 0.3% NaCl (1:1), перемешивали и оставляли в длительной воронке при температуре 4<sup>0</sup> – 6<sup>0</sup>С на 12 часов. Затем сливали нижний слой в чашку для упаривания, которую оставляли под тягой до высыхания. Полученный материал хранили в темном месте при температуре +4<sup>0</sup> – +6<sup>0</sup>С.

## 2.7 Определение компонентов фосфолипидных фракций

Основные компоненты фосфолипидных фракций определяли с помощью одномерной тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» (Чехия) в системе растворителей хлороформ : метанол : вода (65:30:5) и двумерной ТСХ в двух системах растворителей хлороформ: метанол: вода (65:25:4) и хлороформ : метанол : 25% аммиак (6:25:5) на пластинках «Merck» (Германия) и «Silufol» (Чехия) на стеклянной основе. В качестве контроля использовали препараты фосфолипидов: фосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозит и фосфатидилсерин фирмы «Sigma» (США). Хроматограммы проявляли 5% раствором фосфорномолибденовой кислоты в этаноле, 0.2% раствором нингидрина в этаноле, реактивом Шиффа.

Количественный анализ фосфолипидов проводили методом сканирования хроматограммы на сканере «Epson Perfection 3490 PHOTO» (Япония) с использованием программы «Digital». Процентное содержание фосфолипидов оценивали по интенсивности окраски соответствующих зон относительно их суммы.

## 2.8 Измерение дифракционных спектров

Для дифракционных измерений использовали образцы липидных фракций актиномицетов с разным уровнем гидратации – липиды, частично гидратированные парами воды из воздуха и в избытке воды. Образцы фосфолипидов, выделенные из мембран актиномицетов, помещали в кварцевые капилляры диаметром 1.5 мм и толщиной стенки 0.01 мм (GLAS, Германия). Измерение дифракционных спектров проводили на установке «Дикси» синхротронного источника Сибирь-2 РИЦ «Курчатовский институт» при комнатной температуре на расстоянии образец – детектор  $L_{sd} = 271$  мм и длине волны фотона 1,63 Å. Расчеты параметров структур, образованных липидами

фосфолипидных фракций актинобактерий, проводили ранее описанными методами [Киселев и др., 2010; Киселев, 2011]:

$$q = \frac{4\pi \sin(\theta/2)}{\lambda}$$

$q$  – модуль вектора рассеяния

$\theta$  - угол рассеяния падающего излучения

$\lambda$  – длина волны падающего излучения

$$d = 2\pi/\Delta q$$

$d$  – период повторяемости

## 2.8 Изучение антагонистических свойств актиномицетов

Антибиотические свойства выделенных культур актиномицетов проверяли двумя методами: методом перпендикулярных штрихов на органическом агаре 2 Гаузе и методом диффузии антибиотика в агар [Егоров Н.С., 1986]. В качестве тест-организмов использовали следующие культуры: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042.

Для изучения антагонистической активности методом перпендикулярных штрихов по диаметру чашки Петри с органической агаровой средой №2 Гаузе наносили культуру актиномицета. Чашку Петри помещали в термостат при температуре 28<sup>0</sup>С. После того, как культура актиномицета выростала (3-10) суток, перпендикулярно штриху наносили культуры тест-организмов. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 37<sup>0</sup>С, результат оценивали через 24 часа по зонам подавления роста тест-организмов.

Для определения антибиотической активности методом диффузии в агар, актиномицеты выращивали в жидких средах при температуре 28<sup>0</sup>С в колбах

Эрленмейера объемом 750 мл (объем питательной среды составлял 150 мл) на качалках со скоростью 180 об/мин. Были использованы следующие питательные среды: жидкая органическая среда №2 Гаузе, жидкая органическая среда №2 Гаузе с мелом, среда 6613, среда 330, среда «сахарозная», среда 2663, среда А4, среда 5339. Антибиотическую активность определяли в динамике на 3, 5, 7, 10 сутки роста, после осаждения мицелия вносили по 0,2 мл в лунки, проделанные в агаризованной среде № 2 Гаузе, предварительно засеянной тест-культурой. Через 24 часа определяли антибиотическую активность по диаметру зоны, на которой отсутствует рост тест-организма.

### **2.10 Изучение влияния адреналина, сока алоэ древовидного и тест-микроорганизмов на антибиотическую активность выделенных актиномицетов.**

Для изучения влияния адреналина на антибиотическую активность культур актиномицетов использовали синтетический адреналин под торговым названием «Адреналин (эпинефрин)» (Московский эндокринный завод, Россия). Адреналин вносили в колбы с жидкими питательными средами, предварительно засеянные культурами актиномицетов. Концентрация адреналина составляла 0,5, 1,0, 1,5 мкг/мл.

Сок алоэ древовидного (получение сока описано в главе 2.2.) вносили в колбы с жидкими питательными средами, предварительно засеянными культурами актиномицетов. Концентрация сока алоэ составляла 5%, 10% от объема питательной среды.

Для изучения влияния тест-микроорганизмов на антибиотическую активность актиномицетов, использовали следующие культуры: *Staphylococcus aureus* ИНА 00762 и *Micrococcus luteus* ATCC 9341. К молодой культуре актиномицета, выращенной в жидкой среде в течение 48 часов, добавляли инактивированные автоклавированием тест-микроорганизмы в количестве 10 мл на

100 мл среды (концентрация  $10^6$  КОЕ/мл, определенная по стандарту мутности Макфарленда) и живые культуры *Micrococcus luteus* ATCC 9341 в количестве 1 мл на 100 мл среды (концентрация инокулята  $10^6$  КОЕ/мл).

## **2.11 Изучение влияния низкотемпературного замораживания на выживаемость и сохранение антибиотических свойств актиномицетов**

Культуры актиномицетов выращивали в пробирках на агаризованной овсяной среде при температуре  $28^{\circ}\text{C}$  до стационарной фазы роста, для которой характерно появление воздушного мицелия с активным спороношением. Затем споры смывали стерильной дистиллированной водой. Полученные суспензии отфильтровывали через стерильный бумажный фильтр «Ф» ГОСТ 12026-76 ОАО «Химмед» (Россия) и разливали в криопробирки объемом 2 мл «Greiner bio-one» (Германия). Для сравнения выживаемости в присутствии криопротектора или без него, часть суспензий замораживали в дистиллированной воде без использования криопротектора, другую часть в присутствии криопротектора - 10% раствора глицерина «Реахим» (Россия). Объем суспензий, внесенных в криопробирки, составлял 1 мл. Замораживание и хранение образцов проводилось в низкотемпературном морозильнике Revco «Thermo Scientific» (США) при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Процесс восстановления замороженных культур осуществлялся путем оттаивания при комнатной температуре.

Количество жизнеспособных клеток определяли методом подсчета КОЕ после высева проб на чашки Петри с агаровой средой №2 Гаузе. Процент выживших КОЕ актиномицетов рассчитывали относительно числа КОЕ, подсчитанных до консервации.

Антибиотическую активность актиномицетов до и после хранения определяли путем засева чашек Петри с выросшими колониями актиномицетов двухсуточной культурой *Micrococcus luteus* ATCC 9341. После инкубации в течение суток при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  подсчитывали количество колоний



актиномицетов с зонами подавления роста тест-организма. Затем отбирали активные колонии, пересевали на чашку Петри и проводили определение антибиотической активности к тест-микроорганизмам методом перпендикулярных штрихов. У культур, не обладающих антибиотической активностью в отношении *Micrococcus luteus*, отбирали по 20 колоний с каждой чашки и затем определяли их антибиотическую активность.

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

Изучение выживаемости штаммов актиномицетов *Nonomuraea roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06 и *Streptomyces hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup> при различных концентрациях споровых суспензий проводили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  при условиях, описанных выше в этой главе. Споровые суспензии были использованы в следующих концентрациях:  $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  КОЕ/мл. Концентрации споровых суспензии  $10^5$ - $10^7$  были получены при смыве воздушного мицелия актиномицета, выросшего на одной пробирке со скошенной овсяной средой, 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрацию  $10^2$  КОЕ/мл получали разведением исходной суспензии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Глава 3. ИЗУЧЕНИЕ ФАЗОВО - СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ФОСФОЛИПИДНОЙ ФРАКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН АКТИНОМИЦЕТОВ

Адаптация микроорганизмов к условиям окружающей среды во многом зависит от состава и строения клеточной мембраны. Нормальное функционирование и стабильность клеточных мембран в первую очередь определяется физико-химическим состоянием молекул фосфолипидов – основных структурообразующих компонентов клеточных мембран [Williams, 1990; Грачева и др., 2011, Бланков, Клебанов, 1961; Белоус, Грищенко 1994; Грачева, Осин, 2016; Simione F.P. 1998, Chen et al., 2006; Dumont, 2006].

Клеточные мембраны имеют бислойную конфигурацию. Сохранение бислойной структуры мембраны зависит от фазовых переходов мембранных липидов. Изучение фазовых переходов мембранных липидов является важным аспектом при выяснении механизмов повреждения клеточных мембран в ответ на воздействие стрессовых факторов, например, замораживания. Сведения о фазовых переходах важны для выяснения механизмов действия защитных сред [Williams, 1990].

Известно, что результат воздействия стрессовых факторов на фазовое состояние мембранных липидов во многом зависит от качественного и количественного состава липидов [Nichols et al., 2000].

Объектами исследования являлись коллекционные культуры актиномицетов *Nonomuraea roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06 и *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup> (Рис. 1 – 3). Культуры выращивали до стационарной фазы роста на питательных средах в погруженных условиях. Выделение фосфолипидных фракций проводили методом, описанным в главе 2.6.

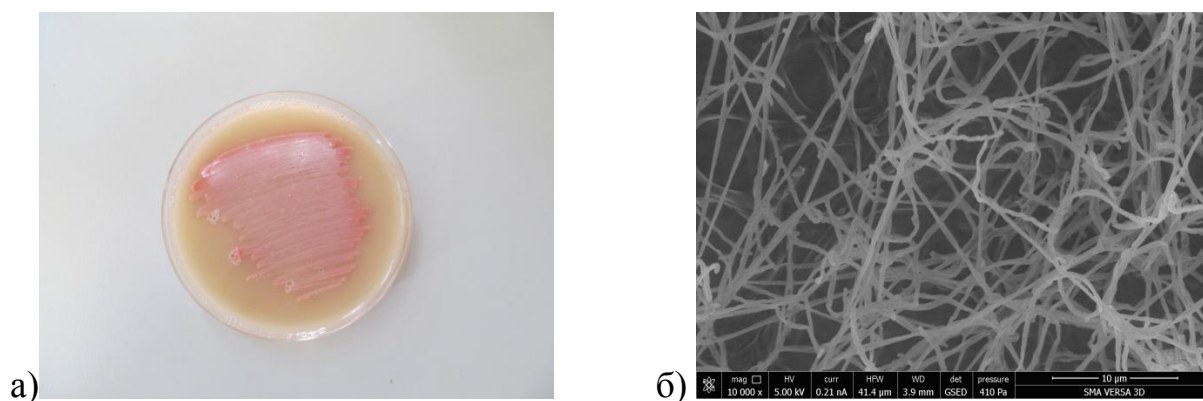


Рис. 1 *Nonomuraea roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281 а) рост на овсяном агаре; б) воздушный мицелий (сканирующий электронный микроскоп, увеличение  $\times 10000$ ).

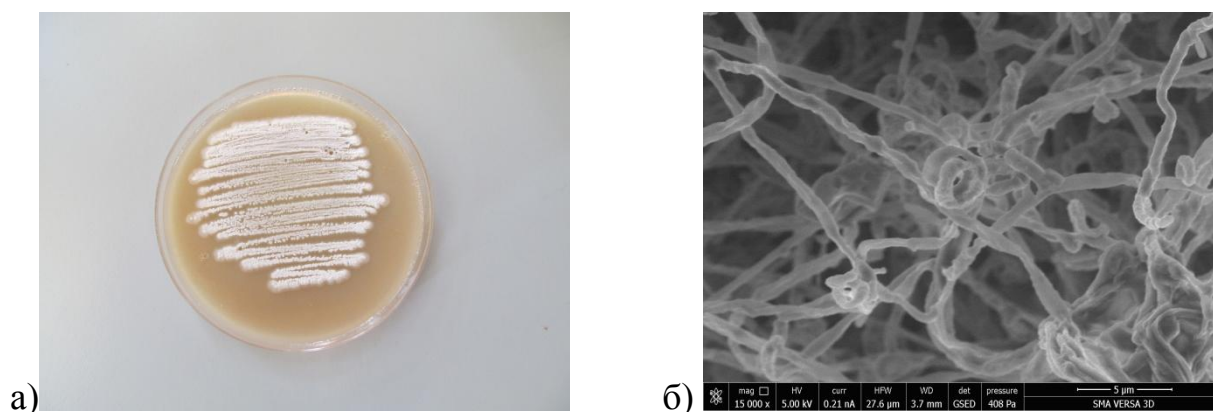


Рис. 2 *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup> а) рост на овсяном агаре; б) воздушный мицелий (сканирующий электронный микроскоп, увеличение  $\times 15000$ ).



Рис. 3 *Streptosporangium* sp. INA 34-06 а) рост на овсяном агаре; б) воздушный мицелий (сканирующий электронный микроскоп, увеличение  $\times 15000$ ).

Как известно, именно в стационарной фазе роста клеточные мембраны микроорганизмов наиболее устойчивы к воздействию неблагоприятных условий [Белоус и др., 1979]. Стационарная фаза роста характеризуется постоянством и сбалансированностью липидного состава [Ефимова и др., 1977; Noischen et al., 1997].

Изучение состава липидных фракций клеточных мембран актиномицетов показало, что преобладающими компонентами фосфолипидной фракции *Str.hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup> являются: фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит и фосфатидилсерин, преобладающими компонентами той же фракции у *Nonomuraea roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281 - фосфатидилэтанолламин, у *Streptosporangium* sp. INA 34-06 - фосфатидилэтанолламин и фосфатидилглицерин. Результаты тонкослойной хроматографии представлены в таблице 1.

Таблица 1. Состав фосфолипидных фракций клеточных мембран актиномицетов.

Фосфолипиды	Содержание фосфолипидов (%)		
	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> RIA 1433 <sup>T</sup>	<i>Nonomuraea roseoviolaceae</i> subsp. <i>carminata</i> INA 4281	<i>Streptosporangium</i> sp. INA 34-06
Фосфатидилглицерин	61	<1	14
Фосфатидилинозит	22	0	0
Фосфатидилсерин	14	<1	<1
Фосфатидил-этанолламин	0	81	72
Лизофосфатидил-этанолламин	0	4	3
Аминосодержащий фосфолипид	0	8	5
Фосфатидная кислота	2	4	4
Неидентифицированные липиды	1	2	2

Для дифракционных измерений использовали образцы липидных фракций актиномицетов, которые помещали в кварцевые капилляры диаметром 1,5 мм и толщиной стенки 0,01 мм. Измерения дифракционных спектров проводили на установке Дикси синхротронного источника Сибирь – 2 РНЦ «Курчатовский институт» при комнатной температуре. С помощью дифракционного спектрометра Дикси можно одновременно проводить измерения ламеллярной и латеральной дифракции липидных мембран [Киселёв и др., 2010].

Дифракционный спектр фосфолипидной фракции культуры *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, частично гидратированной парами воды из воздуха, представлен на рисунке 4. Расположение пиков спектра позволяет говорить о том, что липиды находятся в двух фазовых состояниях: L(I) и L(II) ламеллярной конфигурации. Положение дифракционных пиков  $q_1=0.0846 \text{ нм}^{-1}$  и  $q_2=0.1669 \text{ нм}^{-1}$  фазы L(I) указывает на существование ламеллярной структуры с периодом повторяемости  $d_1=7.63 \text{ нм}$ , ( $d=2\pi/\Delta q$ ;  $d$  – период повторяемости,  $q$  – модуль вектора рассеяния). Период повторяемости пика второй ламеллярной фазы L(II)  $d_2=3 \text{ нм}$ . Небольшое значение периода повторяемости возможно при существовании плотной упаковки липидов в фазе со взаимным проникновением углеводородных цепочек. Исходя из полученных данных, следует, что в условиях дефицита воды липиды фосфолипидной фракции *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup> образуют мультиламеллярные слои довольно плотной упаковки.

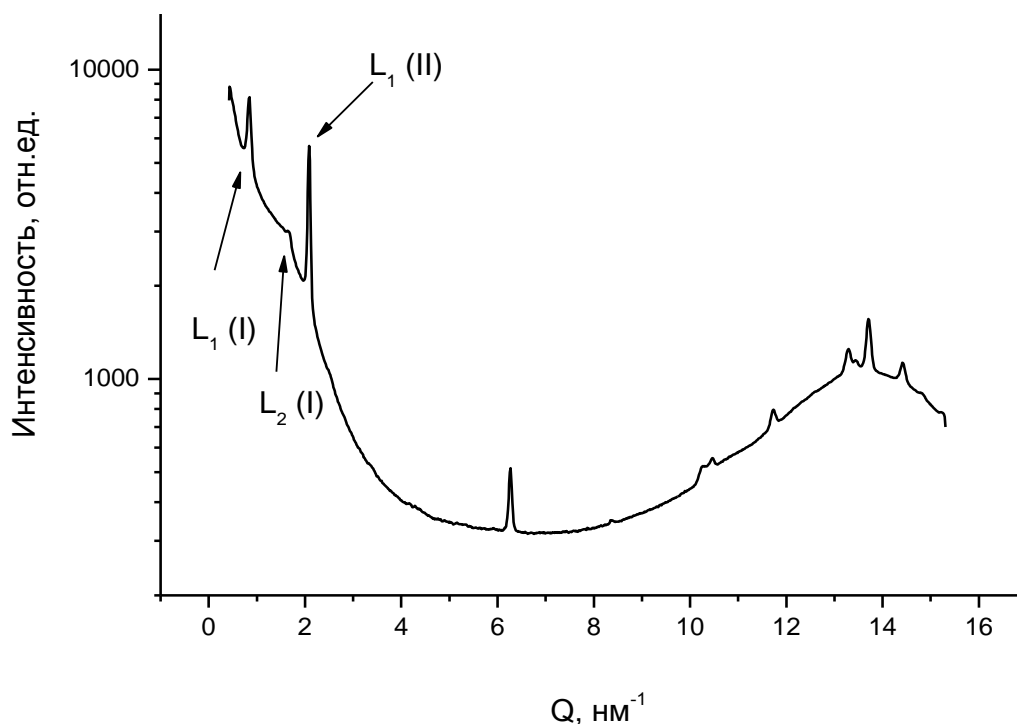


Рис.4. Дифракционный спектр от ламеллярной ( $q < 6 \text{ нм}^{-1}$ ) и латеральной ( $q \approx 1.5 \text{ нм}^{-1}$ ) структуры многослойных агрегатов частично гидратированной фосфолипидной фракции *Str. hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>: Q - вектор рассеяния; L<sub>1</sub>(I), L<sub>2</sub>(I), L<sub>1</sub>(II)- пики первого и второго порядка двух ламеллярных фаз липидов фракции.

Известно, что показателем стабильности самоорганизующихся липидных структур и их термодинамического равновесия может служить обратимость процесса их образования при нагревании и охлаждении [Ефимова и др, 1977].

Наши исследования показали, что при нагревании образца частично гидратированной фосфолипидной фракции *Str. hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup> до температуры 60°C происходит его деструктуризация (рис. 5). Измерение дифракционных спектров после охлаждения образца до 25°C, показало, что первоначальная структура фосфолипидной фракции не восстановилась. После 10 месяцев хранения образца при +4°C было проведено повторное измерение спектров, которое показало, что фосфолипидная фракция *Str. hygroscopicus* полностью восстановила свою структуру. Полученные результаты можно объяснить тем, что в исследованном образце наряду с основными,

доминирующими липидами, содержались минорные компоненты, которые могли оказывать влияние на процесс структуризации липидов.

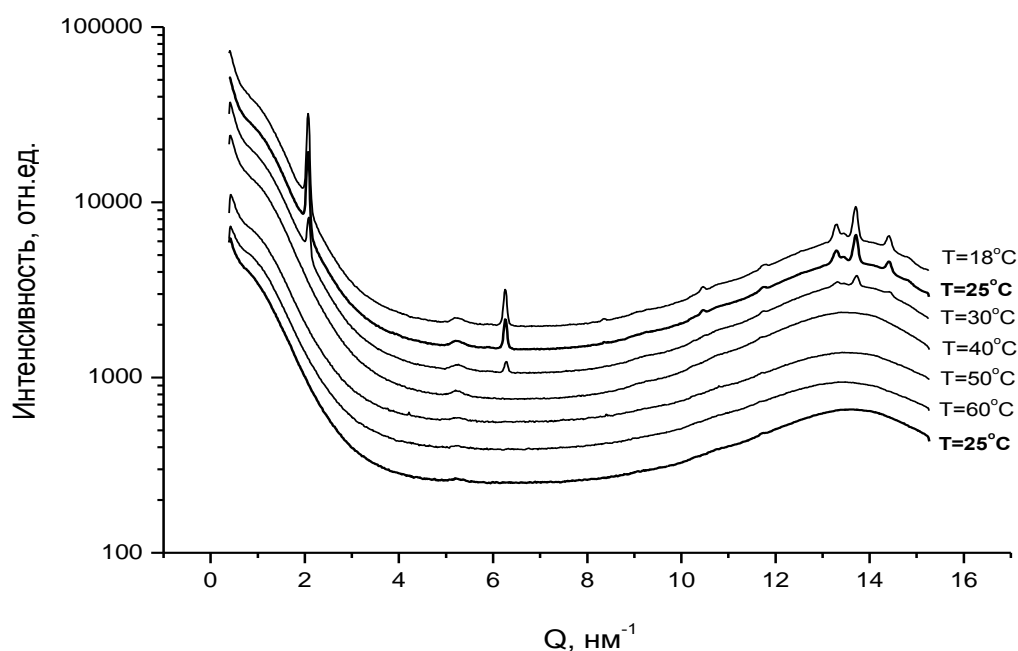


Рис.5. Изменение дифракционной картины от образца частично гидратированной фосфолипидной фракции *Str. hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup> при нагревании от 18°C до 60°C и последующем охлаждении до 25°C.

Дифракционные спектры, частично гидратированной парами воды из воздуха, фосфолипидной фракции культуры *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 (рис. 6) показали наличие инвертированной гексагональной (ИГ) фазы. Параметр  $a$  гексагональной структуры (расстояние между центрами цилиндров) равен 4.66 нм. При повторном измерении дифракционного спектра через две недели, значение параметра  $a$  изменилось до 4.93 нм. Эти данные свидетельствуют о том, что структура липидов нестабильна – расстояние между центрами цилиндров и размеры самих цилиндров, меняются с течением времени.

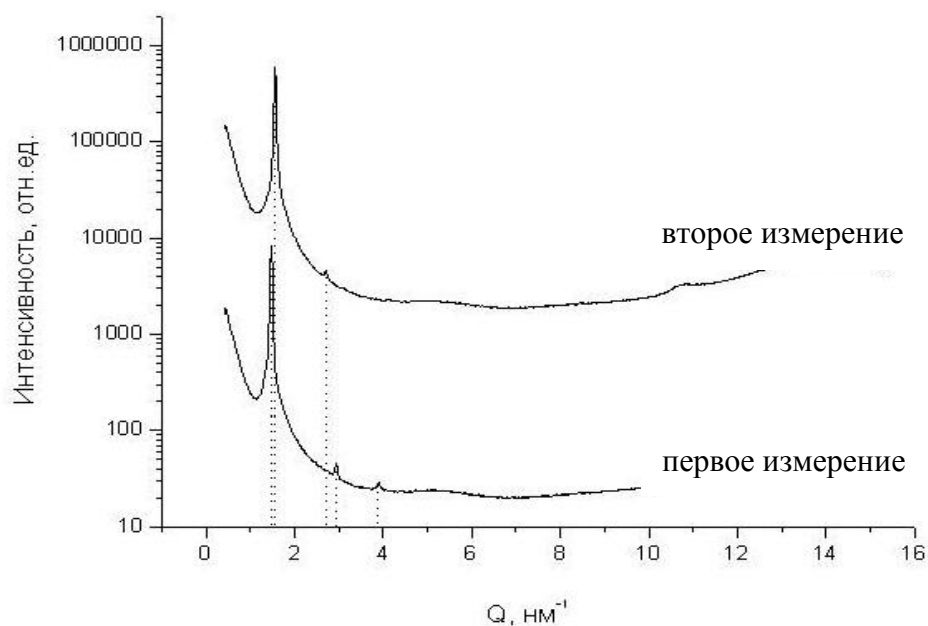
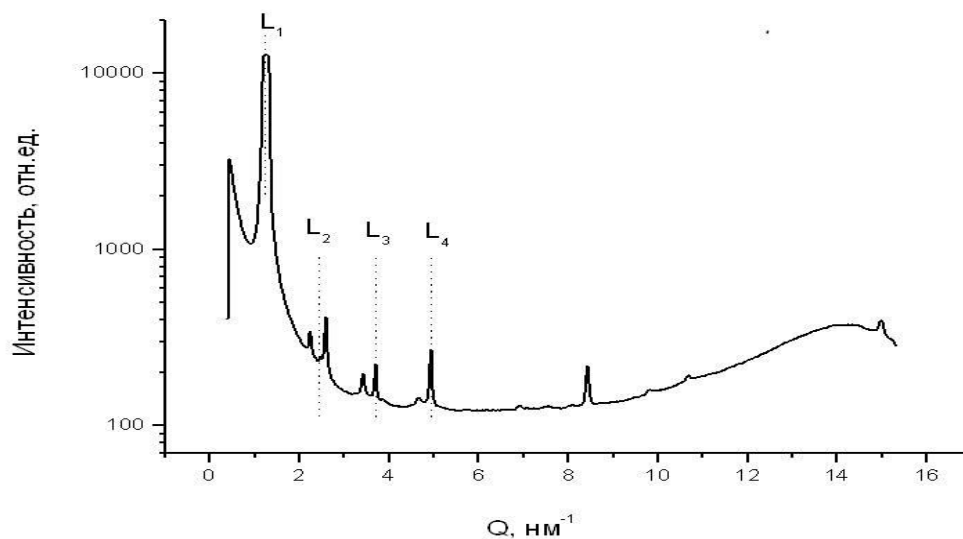


Рис.6. Дифракционные спектры от частично гидратированной фосфолипидной фракции *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281. Пунктиром показаны пики от инвертированной гексагональной структуры (HII).

Наши исследования показали, что липиды фосфолипидной фракции *Streptosporangium sp.* INA 34-06 при недостатке воды находятся в двух фазовых состояниях – ламеллярной и инвертированной гексагональной (HII) (рис.7). Расположение пиков ламеллярной жидкокристаллической фазы указывает на образование липидами многослойной мембраны с периодом повторяемости  $d = 5.07$  нм. Параметр  $a$  гексагональной структуры (расстояние между центрами цилиндров) равен 5.60 нм.



А)



Б)

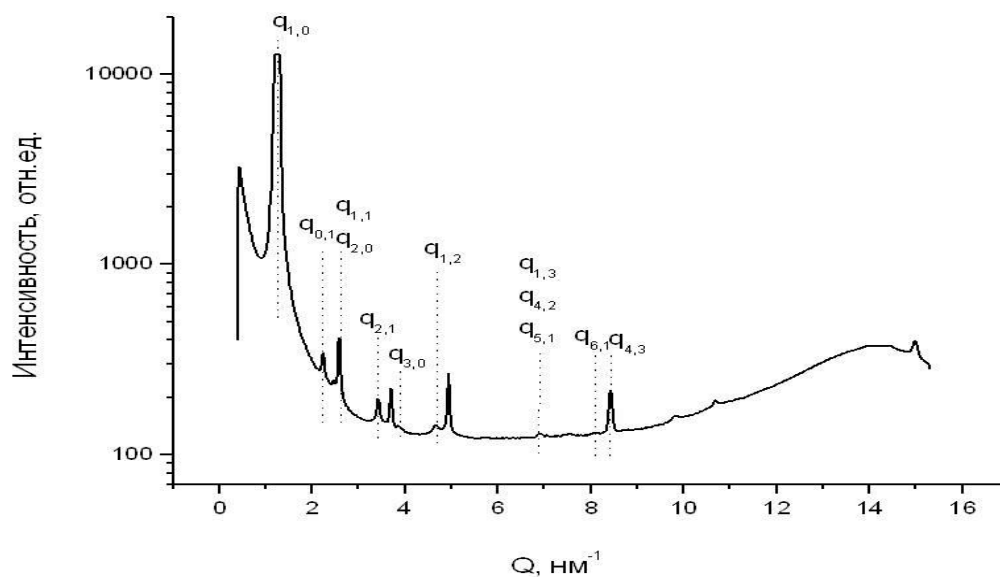


Рис. 7. Дифракционный спектр частично гидратированной фосфолипидной фракции *Streptosporangium sp.* INA 34-06. А. – пики ( $L_i$ ) от ламеллярной структуры жидкокристаллической фазы ( $i$  - порядок отражения). Б. – пики ( $q$ ) от инвертированной гексагональной структуры (НГ) жидкокристаллической фазы ( $i, j$  индексы Миллера (кристаллографические индексы)).

После 10 месяцев хранения при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  были проведены измерения спектров дифракции частично гидратированных фосфолипидных фракций. Данные измерения проводили с целью определения стабильности фазово-структурных состояний липидов. Результаты показали существенные различия в дифракционной картине фазовых состояний липидов. Структура образца *Str. hygrosopicus* не изменилась в процессе хранения, в то время как структура фосфатидилэтаноламинсодержащих фосфолипидных фракций *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 и *Streptosporangium sp.* INA 34-06 претерпела значительные изменения. Ранее отмечалось изменение параметров гексагональной структуры липидов *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 при измерениях, проведенных с интервалом в 2 недели. При последующем измерении этого же образца после 10 месяцев хранения произошло значительное изменение параметров гексагональной фазы ( $a = 7.32$  нм) и была выявлена ламеллярная фаза мембранной структуры с периодом повторяемости  $d = 5.56$  нм (рис.8). Обнаружено также изменение параметров двухфазового состояния липидов фракции *Streptosporangium sp.* INA 34-06 (рис.9). В результате после хранения в структурной организации фосфолипидных фракций культур актиномицетов *Streptosporangium sp.* INA 34-06 и *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 появились сходные черты

Следующим этапом нашей работы было изучение гидратированных образцов фосфолипидных фракций актиномицетов. Изучение фазово-структурного состояния образцов проводили в избытке воды. Результаты экспериментов показали, что после добавления воды не наблюдается существенных изменений в параметрах мембранных структур, построенных на основе липидов фракции *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>. Это объясняется тем, что плотная упаковка мультиламеллярных слоев этих структур, препятствовала быстрому проникновению молекул воды в межмембранное пространство, в связи с чем процесс гидратации требовал большей продолжительности. В тоже время, гидратация образцов липидных фракций *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 и *Streptosporangium sp.* INA 34-06 привела к существенным изменениям их

структуры. При гидратации образца *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 отмечено увеличение расстояния между бислоями мембранной структуры ( $d = 5.76$  нм), образованной липидами ламеллярной фазы, а также между цилиндрами гексагональной фазы ( $a = 7.71$  нм), то есть, образец находился в состоянии "набухания" [Рябова и др., 2010] (рис.8). Дифракционный спектр гидратированного образца *Streptosporangium* sp. INA 34-06 характеризовался исчезновением («размытием») ранее существовавших и появлением новых пиков (рис.9). Такой вид спектра свидетельствовал о смешивании или образовании новой (новых) фаз липидов фракции. По-видимому, из-за незавершенности процесса гидратации структура образца не пришла в равновесное состояние на момент проведения измерений.

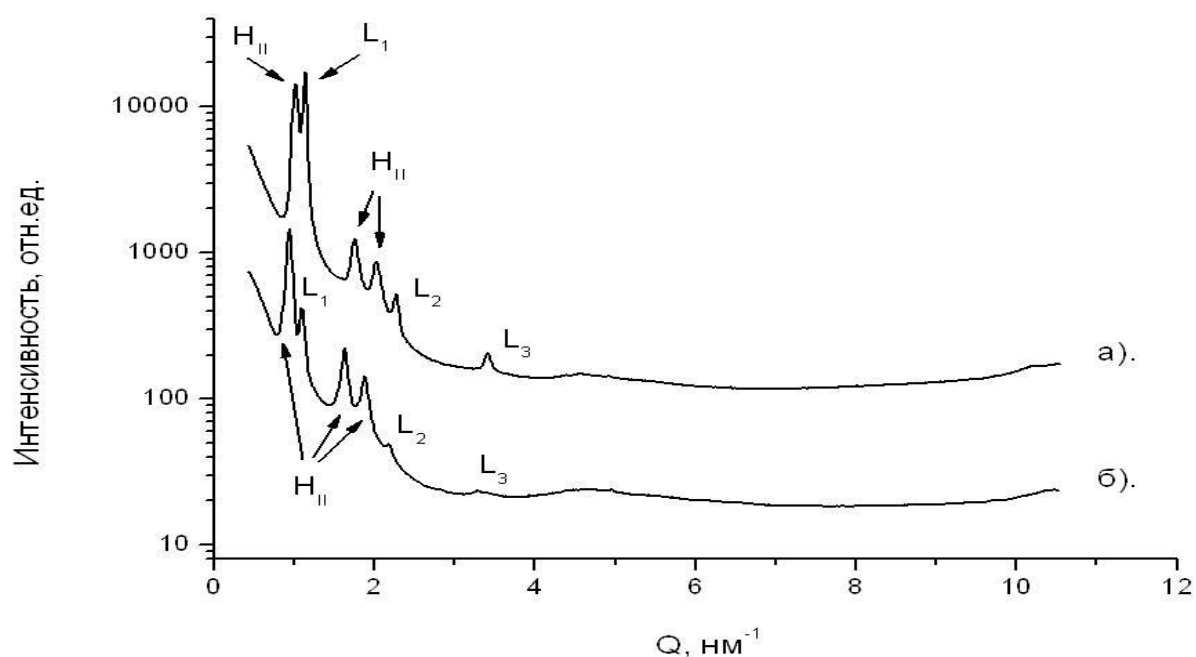


Рис.8. Дифракционные спектры от фосфолипидной фракции *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281. а) частично гидратированный образец после 10 месяцев хранения при  $+4^{\circ}\text{C}$ , б) полностью гидратированный образец. Пики от ламеллярной структуры жидкокристаллической фазы помечены индексами  $L_i$ , где  $i$  – порядок отражения, пики от инвертированной гексагональной структуры обозначены  $H_{II}$ .

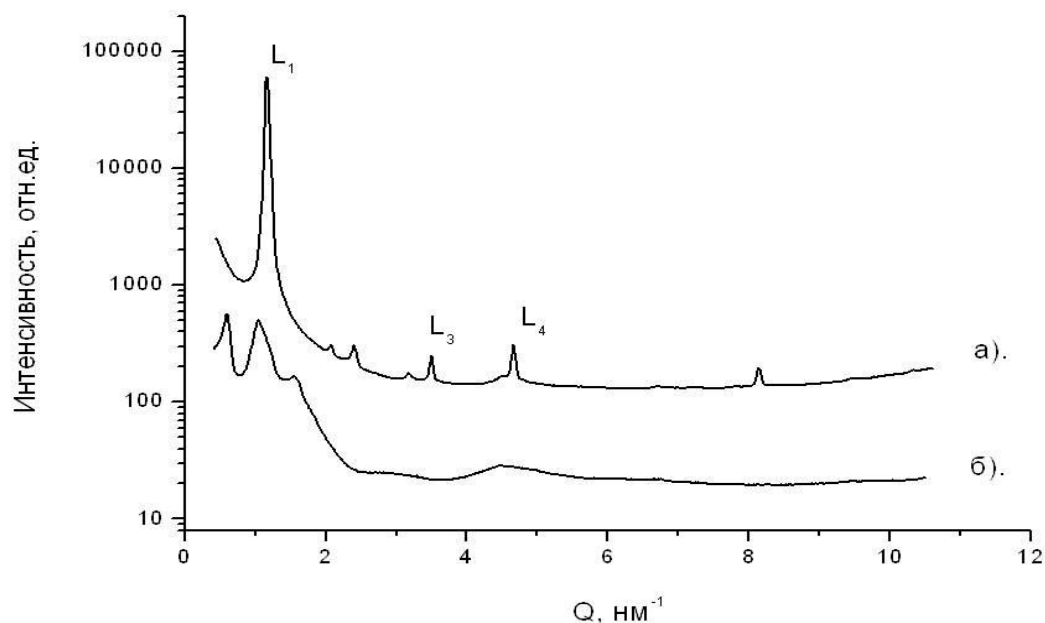


Рис.9 Дифракционные спектры от фосфолипидной фракции *Streptosporangium sp.* INA 34-06. а) частично гидратированный образец после 10 месяцев хранения при температуре +4°C, б) полностью гидратированный образец. Пики от ламеллярной структуры жидкокристаллической фазы помечены индексами  $L_i$ , где  $i$  – порядок отражения.

Исследования показали, что фосфолипидные фракции клеточных мембран актиномицетов имеют различную структурную организацию, которая определяется составом доминирующих фосфолипидов, температурными условиями и гидратацией (частичной или полной). Фосфатидилглицерин – основной компонент фосфолипидной фракции *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, его молекулы образуют только ламеллярную фазу в диапазоне температур до +55°C и степени обводненности в диапазоне 20-95% в/в [Morein et al., 1996]. Таким образом, мультиламеллярная структурная организация фосфолипидной фракции *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup> в условиях недостатка воды, формировалась за счет данного фосфолипида. Образец по своей структурной организации был однороден и отличался стабильностью.

Фазово-структурная организация фракций мембранных липидов исследованных *Streptosporangium sp.* INA 34-06 и *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 была не стабильна. Их фазовое состояние зависело от уровня гидратации, и изменялось в процессе хранения. Структурная нестабильность липидных фракций данных актиномицетов объясняется высоким содержанием в них фосфатидилэтаноламина. Минорные компоненты, такие как фосфатидилглицерин способствуют формированию бислойных структур, а при понижении температуры препятствуют кристаллизации бислоя, что приводит к образованию стабильной гелевой фазы [Белоус и др., 1979].

**Глава 4. ХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР АКТИНОМИЦЕТОВ *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *Streptosporangium sp.* INA 34-06 и *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 МЕТОДОМ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ**

Сохранение бислойной структуры мембран зависит от качественного и количественного состава мембранных липидов, а также от фазовых переходов липидов, но при создании определенных условий замораживания и хранения мембранные повреждения могут носить обратимый характер [Бекер, 1987; Грачева, Осин, 2016; Филиппова, 2012; Williams, 1990].

Наши исследования показали, что фазово-структурная организация мембранных липидов культур актиномицетов *Streptosporangium sp.* INA 34-06 и *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 была нестабильна и изменялась в процессе хранения образцов, в отличие от культуры *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, фазово-структурное состояние фосфолипидной фракции которого было стабильным и при нарушении восстанавливалось через определенный промежуток времени.

Исходя из полученных данных можно сделать предположение, что выживаемость и сохранение свойств при длительном хранении у *Str. hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup> будет выше, чем у *Streptosporangium sp.* INA 34-06 и *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281.

Исходя из данных литературы и полученных нами результатов о липидном составе и фазово-структурной организации фосфолипидов у изучаемых актиномицетов решено было проверить выживаемость и сохранение антибиотических свойств 3-х коллекционных культур актиномицетов при хранении в условиях низких температур (-70<sup>0</sup>С) в течение длительного периода времени.

Было проведено исследование влияния криопротектора 10% р-ра глицерина («Реахим» РФ) на выживаемость и сохранение антибиотической активности

данных культур. Для этого клетки замораживали в двух вариантах: без глицерина и с добавлением глицерина.

На протяжении всего периода хранения проводили проверку антибиотической активности актиномицетов в отношении тест-микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042.

Так как все изучаемые культуры (*Streptosporangium sp.* INA 34-06, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>) обладают способностью к спороношению в стационарной фазе роста, то замораживанию подвергались споры данных микроорганизмов. Споровые суспензии были взяты в следующих концентрациях:  $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  КОЕ/мл. Процесс восстановления клеток после хранения осуществляли путем оттаивания при комнатной температуре.

Пробы отбирали каждый месяц в течение 1,5 лет, потом каждые 6 месяцев до 3 лет хранения. В таблице 2 приведены данные по количеству выживших колоний в течение 3-х лет при концентрации клеток  $10^5$  КОЕ/мл. Согласно представленным в таблице данным, выживаемость актинобактерий *Str.hygroscopicus* RIA 1433T, *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Streptosporangium sp.* INA 34-06 в концентрации  $10^5$  КОЕ/ мл находилась на постоянном уровне в течение всего периода хранения. В опытах с использованием криопротектора – 10% раствора глицерина, и без него уровень выживаемости актинобактерий был одинаковым.

Таблица 2. Жизнеспособность исследуемых культур актиномицетов при хранении при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  в концентрации  $10^5$  КОЕ/мл

Название штамма	Наличие криопротектора	Число жизнеспособных клеток КОЕ/мл $\times 10^5$					
		До заморозки	1 месяц	6 месяцев	1 год	1,5 года	3 года
<i>Streptosporangium</i> sp. INA 34-06	нет	56,8 $\pm$ 4,65	56,2 $\pm$ 3,2	56,6 $\pm$ 3,4	57 $\pm$ 3,75	56,6 $\pm$ 3,46	57,2 $\pm$ 4,2
	10% р-р глицерина	58,3 $\pm$ 4,25	57 $\pm$ 3,75	59,4 $\pm$ 5,7	57 $\pm$ 2,92	58,4 $\pm$ 6,6	58,6 $\pm$ 3,6
<i>Streptomyces hygrosopicus</i> RIA 1433 <sup>T</sup>	нет	20 $\pm$ 1,31	19,6 $\pm$ 2,3	19,6 $\pm$ 1,7	18,8 $\pm$ 1,33	19,8 $\pm$ 2,1	19,2 $\pm$ 1,3
	10% р-р глицерина	18,4 $\pm$ 1,83	18,8 $\pm$ 1,6	18,8 $\pm$ 2,2	18,9 $\pm$ 1,25	18,9 $\pm$ 1,57	18,6 $\pm$ 2,0
<i>Nonomuraea roseoviolacea</i> subsp. <i>carminata</i> INA 4281	нет	23 $\pm$ 1,05	23 $\pm$ 1,33	22,6 $\pm$ 1,44	23,6 $\pm$ 0,98	23,2 $\pm$ 1,05	23,4 $\pm$ 1,18
	10% р-р глицерина	18,6 $\pm$ 0,84	18,0 $\pm$ 1,0	18,9 $\pm$ 0,94	18,4 $\pm$ 0,98	18,6 $\pm$ 0,83	18,2 $\pm$ 0,7



При замораживании споровых суспензий исследуемых культур в более высоких концентрациях ( $10^6$  и  $10^7$ ) выживаемость в течение 3-х лет составила 100% у каждого штамма, так же как и в опыте, где концентрация споровых суспензий составляла  $10^5$  КОЕ/мл. Криопротектор так же не влиял на выживаемость актиномицетов.

Исследуемые культуры актинобактерий обладали антибиотической активностью в отношении ряда тест-организмов, поэтому на протяжении всего периода хранения осуществляли контроль антибиотической активности в отношении тест-микроорганизмов. Проверку активности проводили методом засева чашек Петри с выросшими колониями актиномицетов культурой *Micrococcus luteus* ATCC 9341, посеянной в жидкую агаризованную среду №2 Гаузе, после 24 часов инкубирования в термостате при 37<sup>0</sup>С проводили подсчет колоний с зонами подавления роста тест-организма. После подсчета производили сьем 20 колоний каждой культуры, обладающих антибиотической активностью в отношении *M.luteus*, затем была проведена проверка данных колоний актиномицетов в отношении других тест-микроорганизмов. Проверка методом перпендикулярного штриха отобранных колоний актиномицетов – активных в отношении *M.luteus*, показала, что данные колонии были активны и в отношении других тест организмов – *S. aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *S. aureus* ИНА 00761 (MRSA), *S. aureus* ИНА 00762, *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *Sac. cerevisiae* ИНА 01042. Исследования показали, что в течение 3-х лет полностью сохраняется антибиотическая активность в отношении тест-микроорганизмов у штамма *Str.hygroscopicus*, потеря антибиотической активности наблюдалось у культуры *N.roseoviolacea subsp. carminata* (9% колоний), самая большая потеря активности (68% колоний) была у *Streptosporangium* sp. INA 34-06. В таблице 3 показана антибиотическая активность культур до замораживания и после 3-х лет хранения (для колоний, сохранивших антибиотическую активность).

Следует отметить, что антибиотическая активность штамма *Streptosporangium* 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 низких температур ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) является потеря антибиотической активности колониями штамма *Streptosporangium* sp. INA 34-06.

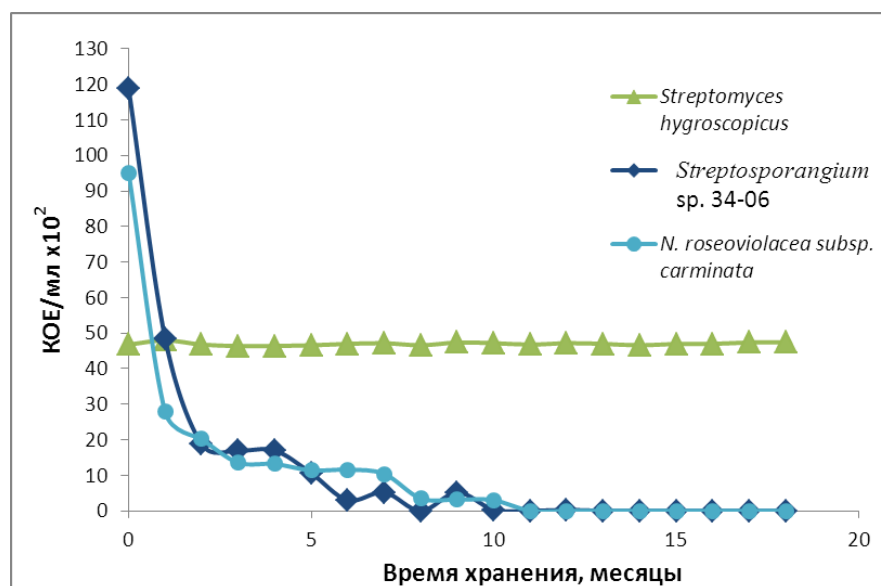
Таблица 3. Антибиотическая активность актиномицетов *Str.hygroscopicus* RIA 1433T, *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06 в отношении тест-организмов.

Название тест-организма	Антибиотическая активность (зона подавления роста, мм)					
	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> RIA 1433 <sup>T</sup>		<i>Nonomuraea roseoviolacea</i> subsp. <i>carminata</i> INA 4281		<i>Streptosporangium</i> sp. INA 34-06	
	до заморозки	после 3-х лет хранения	до заморозки	после 3-х лет хранения	до заморозки	после 3-х лет хранения
<i>S.aureus</i> ИНА 00985 (209P)	25,1±0,43	25,2±0,25	15±0,39	14,8±0,37	10,2±0,46	10,4±0,31
<i>S.aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	24,7±0,48	24,5±0,31	15±0,39	15±0,48	5±0,39	5±0,39
<i>S.aureus</i> ИНА 00762 (209P/УФ-2)	24,9±0,58	25±0,48	19,7±0,39	20,2±0,25	9,7±0,39	9,8±0,37
<i>M.luteus</i> ATCC 9341	25,2±0,25	24,8±0,25	20,2±0,37	20,2±0,37	10,4±0,3	10,4±0,3
<i>B. subtilis</i> ATCC 6533	15±0,28	15±0,39	10,4±0,31	10,2±0,46	5±0,48	5±0,39
<i>E. coli</i> ATCC 25922	14,9±0,33	15±0,39	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Sac.cerevisiae</i> ИНА 01042	20,2±0,25	20±0,39	-	-	-	-

Изучение жизнеспособности клеток при хранении в концентрациях -  $10^2$  КОЕ/мл показало, что даже при низких концентрациях спорных суспензий

штамм *Str.hygroscopicus* не только не утратил жизнеспособности, но и полностью сохранил антибиотическую активность в отношении тест-микроорганизмов в течение 1.5 лет в отличие от культур родов *Nonomuraea* и *Streptosporangium*, которые полностью утратили жизнеспособность после 8-ми месяцев хранения (Рис 10).

а)



б)

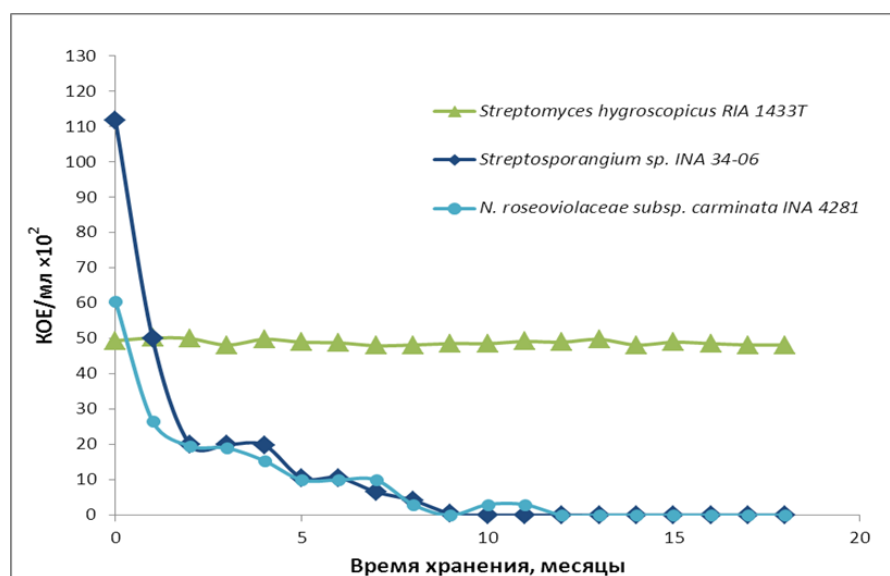


Рис.10. Выживаемость актинобактерий *Str. hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *N.roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06 при хранении при температуре -70<sup>0</sup>С при низкой концентрации спорных суспензий. а) без использования криопротектора, б) с криопротектором.

В данных исследованиях было показано, что коллекционные культуры актиномицетов хорошо переносят низкотемпературное замораживание при концентрации спор  $10^5 - 10^7$  КОЕ/мл, сохраняя высокий титр жизнеспособных клеток. При хранении в низких концентрациях  $10^2$  высокой жизнеспособностью обладали только споры *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>. Использование криопротектора не повлияло на выживаемость клеток при хранении их в высоких концентрациях. Не было выявлено положительного воздействия криопротектора на жизнеспособность клеток актиномицетов при хранении их в низких концентрациях.

## Глава 5. ВЫДЕЛЕНИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ РЕДКИХ РОДОВ ИЗ ПОЧВЫ С ДОБАВЛЕНИЕМ СОКА АЛОЭ

В связи с тем, что биологически активные соединения, выделенные из растений, оказывают стимулирующее влияние на выделение, рост и антибиотическую активность актиномицетов, было решено проверить влияние сока Алоэ древовидного на наличие данного эффекта.

Алоэ древовидное (лат. *Aloe arborescens*, также известно как столетник) - вид растений рода Алоэ семейства Асфodelовые. Алоэ - многолетний вечнозеленый листовый суккулент пустынь Восточной и Южной Африки (растет преимущественно в саваннах). Листья алоэ подвергают биостимуляции в темноте, на холоде в течение 10 дней. При этом образуются биостимуляторы, хорошо растворимые в воде и термически устойчивые. Биогенные стимуляторы - комплекс биологически активных веществ животного и растительного происхождения, оказывающих разностороннее стимулирующее воздействие на различные системы и органы макроорганизма. Качественный и количественный состав биогенных стимуляторов в тканевых препаратах непостоянен и частично зависит от специфики метаболизма самой ткани [Муравьева, 1980; Соколов, Замотаев, 1987].

Для изучения влияния сока алоэ на выделение актиномицетов из почвы, были отобраны образцы дерново-подзолистой почвы города Москвы (образец №1) и чернозема Оренбургской области (образец №2). В пробирки с почвенными суспензиями добавляли отфильтрованный через мембранный фильтр сок алоэ и настаивали в течение 10 минут и 1 часа, затем высевали на чашки Петри с питательной средой. В контрольные образцы сок алоэ не добавляли. Полученные результаты высевов образца почвы №1 на овсяную среду и среду №2 Гаузе представлены в таблицах 4 и 5; образца почвы №2 представлены в таблицах 6 и 7.

Таблица 4. Количество актиномицетов, выделенных с добавлением сока алоэ на овсяной среде из образца дерново-подзолистой почвы.

Концентрация сока алоэ (%)	Время настаивания суспензии	Количество актиномицетов КОЕ/г почвы×10 <sup>3</sup>		
		Род <i>Streptomyces</i>	Редкие роды	Общее количество
Контроль (без сока алоэ)	10 минут	166 ± 19,2	34 ± 6,8	200 ± 29,3
	1 час	140 ± 19,2	36 ± 12,4	176 ± 19,2
10% алоэ в суспензии	10 минут	216 ± 31,4	40 ± 12,4	256 ± 31,3
	1 час	176 ± 31,4	56 ± 15,7	232 ± 45,7
50% алоэ в суспензии	10 минут	240 ± 35,0	48 ± 9,6	288 ± 45,7
	1 час	200 ± 42,9	48 ± 9,6	248 ± 29,3

Таблица 5. Количество актиномицетов, выделенных с добавлением сока алоэ на среде №2 Гаузе из образца дерново-подзолистой почвы.

Концентрация сока алоэ (%)	Время настаивания суспензии	Количество актиномицетов КОЕ/г почвы×10 <sup>3</sup>		
		Род <i>Streptomyces</i>	Редкие роды	Общее количество
Контроль (без сока алоэ)	10 минут	202 ± 29,3	22 ± 3,3	224 ± 39,9
	1 час	206 ± 19,3	18 ± 1,84	224 ± 20,1
10% алоэ в суспензии	10 минут	248 ± 38,4	48 ± 15,7	296 ± 39,9
	1 час	240 ± 35,1	56 ± 19,2	296 ± 31,3
50% алоэ в суспензии	10 минут	248 ± 29,3	32 ± 7,8	280 ± 42,9
	1 час	216 ± 19,2	32 ± 7,8	248 ± 38,4

Таблица 6. Количество актиномицетов, выделенных с добавлением сока алоэ на овсяной среде из чернозема Оренбургской области.

Концентрация сока алоэ (%)	Время настаивания суспензии	Количество актиномицетов КОЕ/г почвы×10 <sup>3</sup>		
		Род <i>Streptomyces</i>	Редкие роды	Общее количество
Контроль (без сока алоэ)	10 минут	640 ± 55,4	104 ± 19,2	744 ± 39,9
	1 час	608 ± 67,4	120 ± 24,8	728 ± 38,4
10% алоэ в суспензии	10 минут	728 ± 29,3	176 ± 19,2	904 ± 31,4
	1 час	712 ± 29,3	160 ± 27,7	872 ± 29,3
50% алоэ в суспензии	10 минут	680 ± 35,1	160 ± 24,8	840 ± 24,8
	1 час	712 ± 38,4	168 ± 29,3	880 ± 35,1

Таблица 7. Количество актиномицетов, выделенных с добавлением сока алоэ на среде 2 Гаузе из чернозема Оренбургской области.

Концентрация сока алоэ (%)	Время настаивания суспензии	Количество актиномицетов КОЕ/г почвы×10 <sup>3</sup>		
		Род <i>Streptomyces</i>	Редкие роды	Общее количество
Контроль (без сока алоэ)	10 минут	608 ± 29,3	200 ± 42,9	808 ± 67,4
	1 час	616 ± 40,0	168 ± 29,3	784 ± 40,0
10% алоэ в суспензии	10 минут	704 ± 53,2	224 ± 19,2	928 ± 57,6
	1 час	720 ± 36,4	208 ± 35,1	928 ± 57,6
50% алоэ в суспензии	10 минут	696 ± 53,2	288 ± 29,3	984 ± 63,7
	1 час	672 ± 67,4	208 ± 45,7	880 ± 55,4

Первое, что было нами отмечено в процессе эксперимента, что при добавлении сока алоэ в почвенные суспензии, на чашках Петри с питательными средами практически отсутствовал рост немителиальных бактерий и грибных колоний, что значительно облегчило выделение актиномицетов. Отсутствие роста одноклеточных бактерий и грибов, вероятно, связано с бактерицидным и фунгицидным действием сока алоэ.

Полученные данные показали, что из образца №2 (чернозема Оренбургской области) выделилось в 3.5 раза больше колоний актиномицетов, чем из дерново-подзолистой почвы (образца №1). Также было отмечено, что процент колоний редких родов актиномицетов, выросших из образца почвы №2, был выше, чем процент колоний, выросших из образца почвы №1. Доля редких родов актиномицетов образца почвы №1 в контроле составила в среднем 13%, в опытных вариантах – 16.8%. Доля редких родов актиномицетов образца почвы №2 в контроле составила в среднем 19%, в опытных вариантах - 21,8%.

Результаты, представленные в таблицах 4 – 7, показали, что увеличение общего количества выросших колоний в экспериментах с добавлением сока алоэ происходило как за счет увеличения численности актиномицетов рода *Streptomyces*, так и за счет увеличения численности представителей редких родов. Это можно объяснить тем, что на чашках с выросшими колониями актиномицетов

рост быстрорастущих грибных колоний и колоний немителиальных бактерий был минимальным или совсем отсутствовал, что способствовало обильному росту медленнорастущих колоний актиномицетов. Как видно из таблиц 4-7 на чашках со средой Гаузе №2 выросло больше актиномицетных колоний, чем на овсяной среде. Данная закономерность установлена для обоих образцов почвы. Для дерново-подзолистой почвы (образец №1) доля актиномицетов, выделенных на среде Гаузе 2 составила 53%, выделенных на овсяной среде - 47% от общего количества колоний, выделенных из образца. Для образца почвы №2 (чернозем) доля актиномицетов, выделенных на среде №2 Гаузе – 52%, на овсяной среде - 48%. Была отмечена закономерность в соотношении долей выделенных колоний редких родов актиномицетов и актиномицетов рода *Streptomyces*. Для образца почвы №2 (чернозем) наблюдалось небольшое увеличение процентного содержания актиномицетов редких родов до 5% при добавлении сока алоэ. Однако для образца дерново-подзолистой почвы (образец №1) доля выделенных актиномицетов в опытных образцах увеличивалась до 11% по сравнению с контролем (при выделении на среде №2 Гаузе с добавлением 10% сока алоэ, выдерживании суспензии 1 час).

Таким образом, в большинстве вариантов при добавлении сока алоэ наблюдалось пропорциональное увеличение количества выделенных колоний актиномицетов редких родов и колоний актиномицетов, распространенного рода *Streptomyces*, т.е были созданы условия для активного роста представителей обеих групп актиномицетов, но в некоторых вариантах удалось увеличить долю выделенных актиномицетов редких родов.

Всего в ходе работы в чистую культуру было выделено 527 штаммов актиномицетов.



## Глава 6. ИЗУЧЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВЫ С ДОБАВЛЕНИЕМ СОКА АЛОЭ

### 6.1. Определение таксономического положения выделенных культур

Идентификация актиномицетов основывается на определении культуральных, морфологических, физиолого-биохимических и хемотаксономических признаков. К культуральным признакам относят характер роста актиномицетов на жидких и агаризованных питательных средах. Физиолого-биохимические признаки включают в себя такие параметры как рост на различных источниках углерода или без него, разложение сложных соединений, рост при различных значениях рН и температуры и т.п. Количественный и качественный состав химических компонентов клеточной стенки являются хемотаксономическими характеристиками [Гаузе и др., 1983; Shirling and Gottlieb, 1966; Schumann et al., 2009].

Хемотаксономические признаки достаточно стабильны и коррелируют с филогенетическим положением микроорганизмов, так как синтез биополимеров и органических молекул детерминирован большим числом генов. Данные признаки наряду с морфологическими признаками являются удобными и достаточно точными маркерами для определения таксономического положения актинобактерий. Клеточные стенки актиномицетов отличаются наличием диаминокислот и сахаров. Тип клеточной стенки – постоянный признак, который не зависит от условий культивирования. У актинобактерий на основании наличия аминокислот и сахаров выделяют несколько типов клеточных стенок (таблица 8) [Lechevalier et al., 1971; Goodfellow, Cross, 1984; Goodfellow, 1989, Wang, Jiang, 2016].

Таблица 8. Типы клеточных стенок актинобактерий [Goodfellow., 1989].

состав	Тип клеточной стенки								
	I	II	III В	III С	IV	V	VI	VII	VIII
Диамино-кислота	LL-ДАПК	Мезо-ДАПК	Мезо-ДАПК	Мезо-ДАПК	Мезо-ДАПК	-	ДАМ	-	-
аминокислота	Глицин	Глицин	-	-	-	Лизин, орнитин	Глицин, лизин, аспарагиновая кислота	Глицин, лизин	Орнитин
Тип сахаров	-	D	B	C	A	-	-	-	-
Название моносахаридов	Галактоза*	Арабиноза* ксилоза*	Мадуро-роза	Галактоза*	Арабиноза, галактоза	-	Галактоза*	-	Галактоза*

Примечание: ДАПК – диаминопимелиновая кислота, ДАМ – диаминомасляная кислота, \* - компонент характерен для некоторых родов

Актинобактерии, содержащие мезо-ДАПК в составе пептидогликана клеточной стенки, разделяют на четыре группы: А – виды, у которых присутствуют арабиноза и галактоза, но отсутствует ксилоза, В – виды, у которых присутствует мадуроза, С – виды, у которых нет диагностических сахаров (для некоторых видов возможно наличие галактозы), D – виды, у которых присутствуют арабиноза и ксилоза [Lechevalier et al., 1971; Goodfellow, 1989].

Предварительная идентификация выделенных 527 культур актиномицетов на основании морфологических и хемотаксономических признаков – наличия изомеров ДАПК и дифференцирующих сахаров показала, что 426 штаммов актиномицетов относятся к роду *Streptomyces*, 44 штамма к роду *Micromonospora*, 57 штаммов к другим редким родам.

Выделенные из почвы культуры были проверены на антибиотическую активность (методом перпендикулярных штрихов) в отношении тест-микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042. Результаты показали, что 369 штаммов активны в отношении Гр<sup>+</sup> тест-организмов, 79 штаммов актиномицетов активны в отношении Гр<sup>-</sup> тест-организмов, 52 штамма актиномицетов проявляли активность в отношении *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042.

## 6.2 Изучение выделенных культур актиномицетов редких родов

### 6.2.1 Изучение актиномицетов рода *Micromonospora*

Представители рода *Micromonospora* широко распространены в наземных экосистемах, особенно в субстратах, обогащенных растительными остатками, где играют важную роль в разложении органических веществ. [Qiu, 2008; Грачева, 2004].

В наших опытах общее количество выделенных колоний актиномицетов рода *Micromonospora* составило 8,4% от всех выделенных актиномицетов. Из образца дерново-подзолистой почвы была выделена 21 культура, из образца чернозема 23 культуры микромоноспор. Клеточная стенка всех выделенных культур микромоноспор содержала мезо-ДАПК, в гидролизатах клеток присутствовали ксилоза и арабиноза (II тип клеточной стенки). Культуры микромоноспор образовывали хорошо развитый субстратный мицелий с одиночными спорами на овсяном агаре и органическом агаре №2 Гаузе. Колонии, выросшие на агаризованных средах, имели характерную окраску от светло-оранжевого до темно-оранжевого цвета. Большинство культур образовывало черный пигмент. Воздушный мицелий отсутствовал.

Антибиотическая активность на плотных средах в отношении грамположительных бактерий наблюдалась у 6 выделенных культур, в отношении грамотрицательных бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa* и грибов *Sac. cerevisiae* антибиотической активности не было обнаружено ни у одного из штаммов. Выращивание культур в жидких средах (жидкая органическая среда №2 Гаузе с мелом, среда 6613, среда 330, среда сахарозная, среда 2663, среда А4, среда 5339) также не выявило активности в отношении грамотрицательных тест-организмов и дрожжей. Данные по антибиотической активности, определенной методом штриха, представлены в таблице №9.

Таблица 9. Антибиотическая активность культур рода *Micromonospora* по отношению к грамположительным тест-микроорганизмам.

Штаммы рода <i>Micromonospora</i>	Антибиотическая активность в отношении тест-микроорганизмов (зоны подавления, мм);				
	<i>S.aureus</i> ИНА 00985	<i>S.aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	<i>S.aureus</i> ИНА 00762 (УФ-2)	<i>M.luteus</i> ATCC 9341	<i>B. subtilis</i> ATCC 6533
<i>Micromonospora</i> sp. OS/1	-	-	-	10	-
<i>Micromonospora</i> sp. OS/2	10	10	10	20	10
<i>Micromonospora</i> sp. OS/3	-	-	5	25	15
<i>Micromonospora</i> sp. OS/4	10	10	10	10	-
<i>Micromonospora</i> sp. OS/5	-	-	3	20	10
<i>Micromonospora</i> sp. OS/6	10	-	10	20	5

Филогенетический анализ был проведен для 6 культур - *Micromonospora* sp. OS/1, *Micromonospora* sp. OS/2, *Micromonospora* sp. OS/3, *Micromonospora* sp. OS/4, *Micromonospora* sp. OS/5, *Micromonospora* sp. OS/6) проявляющих способность к синтезу антибиотически активных веществ. Культуры под номерами OS/1, OS/2, OS/3 были выделены из образца дерново-подзолистой почвы, культуры под номерами OS/4, OS/5, OS/6 - из образца почвы №2 (чернозем). Филогенетическое дерево построено с помощью программы MEGA6 (рис. 11). Описание культуральных признаков данных культур рода *Micromonospora* представлено в таблице 10.

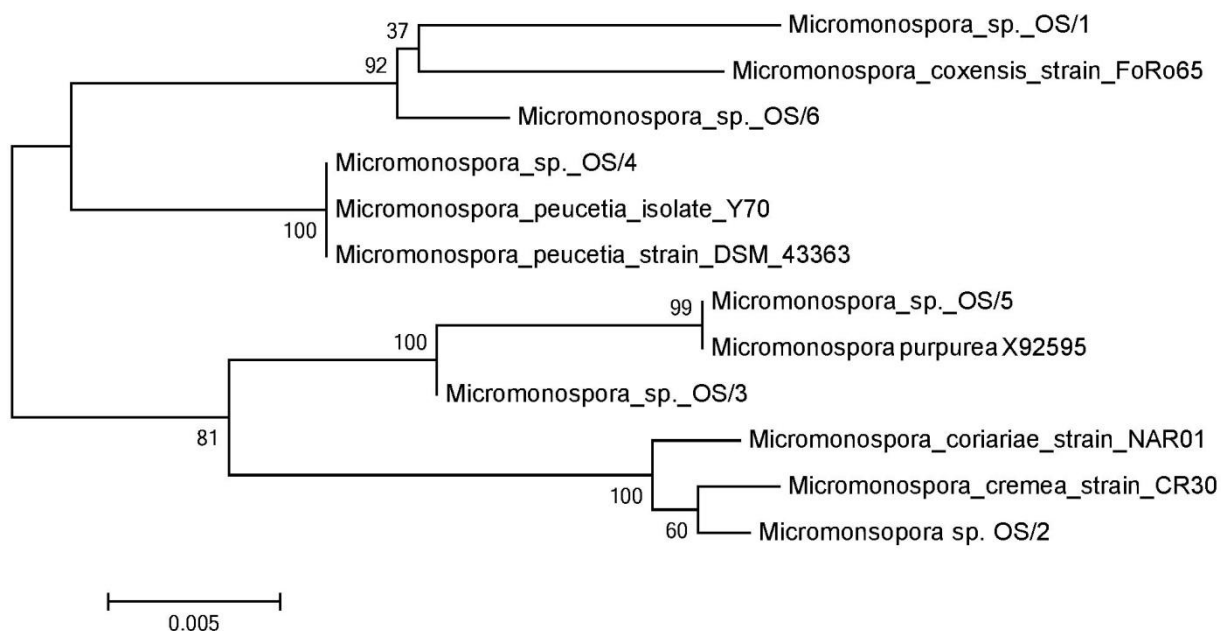


Рис. 11. Филогенетическое дерево почвенных культур рода *Micromonospora*, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «neighbor-joining», масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

Таблица 10. Описание культур рода *Micromonospora* при росте на агаровых средах. Характер роста: + скудный рост, ++ хороший рост, +++ обильный рост.

Характеристики	Штаммы рода <i>Micromonospora</i>					
	OS/1	OS/2	OS/3	OS/4	OS/5	OS/6
Наличие ВМ	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Рост на овсяном агаре	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Рост на среде №2 Гаузе	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Цвет субстратного мицелия на овсяном агаре	светло-оранжевый, оранжевый	оранжевый	оранжевый	светло-оранжевый	оранжевый	светло-оранжевый
Цвет субстратного мицелия на среде №2 Гаузе	оранжевый	оранжевый, темно-оранжевый	светло-оранжевый	оранжевый, темно-оранжевый	светло-оранжевый	оранжевый, темно-оранжевый
Наличие черного пигмента на овсяном агаре	Образуется на ранней стадии роста	Образуется на ранней стадии роста	нет	Образуется на ранней стадии роста	нет	Образуется на ранней стадии роста
Наличие черного пигмента на органической среде №2 Гаузе	Образуется на поздней стадии роста	Образуется на поздней стадии роста	нет	нет	нет	Образуется на поздней стадии роста

### 6.2.2 Изучение культур актиномицетов семейства *Streptosporangiaceae*

Семейство *Streptosporangiaceae* включает следующие роды актиномицетов: *Streptosporangium*, *Nonomuraea*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Microbispora*, *Planotetraspora*, *Herbidospora*, *Acrocarpospora*, *Thermopolyspora*. Типовым родом является род *Streptosporangium*. Это аэробные, хемоорганотрофные, грамположительные актиномицеты, образующие обильно ветвящийся субстратный мицелий. Споры созревают в спорангиях у актиномицетов родов *Planomonospora*, *Planobispora*, *Planotetraspora*, *Acrocarpospora* и *Streptosporangium*, у представителей других родов споры образуют цепочки из двух или более спор. Члены этого семейства в основном обнаружены в почве, небольшое количество видов изолировано с зоны морского побережья и растительных материалов, включая корни и листья. Клеточная стенка актиномицетов данного семейства содержит мезо-ДАПК, в качестве диагностируемого сахара выступает мадуроза [Otoguro et al, 2014].

В опытах нами было выделено 5 культур актиномицетов, отнесенных к роду *Nonomuraea* и 9 культур к роду *Streptosporangium*. Все 14 культур имели III тип клеточной стенки.

К роду *Streptosporangium* были отнесены культуры актиномицетов: OS/7 – OS/15. Культуры под номерами OS/7 – OS/9 были выделены из образца почвы №1, под номерами OS/10 – OS/15 из образца почвы №2. Все выделенные культуры хорошо росли на агаризованных средах (органическая среда №2 Гаузе и овсяная). При росте на овсяной среде все культуры образовывали воздушный мицелий, на котором развивались спорангии. По характеру роста и окраске ВМ и СМ культуры были разделены на три группы, геносистематические признаки описывались для одной культуры из каждой группы.

Группа 1: культуры OS/7, OS/14, OS/15

Овсяный агар: образуют хорошо развитый СМ розового цвета, ВМ хорошо развит, цвет от белого до розового.



Среда 2 Гаузе: образуют хорошо развитый СМ бежевого цвета, светлооранжевого или светлорозового. ВМ не образуется.

Группа 2: культуры OS/8, OS/9, OS/12

Овсяный агар: образуют хорошо развитый СМ от бежевого до светложелтого или светлокорицевого цвета. ВМ белого цвета, хорошо развит.

Среда 2 Гаузе: образуют хорошо развитый СМ бежевого или бежевожелтого цвета. ВМ не образуется.

Группа 3: культуры OS/10, OS/11, OS/13

Овсяный агар: образуют хорошо развитый СМ бежевого цвета. ВМ белого или светлорозового цвета хорошо развит.

Среда 2 Гаузе: образуют хорошо развитый СМ бежевого или светлокорицевого цвета. ВМ не образуется.

Антибиотическая активность в отношении *Micrococcus luteus* обнаружена у двух культур - *Streptosporangium* OS/10 и *Streptosporangium* OS/14, остальные культуры не обладали антибиотической активностью к исследуемым тест-организмам. Антибиотическая активность культуры *Streptosporangium* OS/10 была определена методом перпендикулярного штриха, зона подавления составила 6-7 мм, при глубинном культивировании на жидких средах дополнительной активности выявлено не было. Зона подавления роста *Micrococcus luteus*, определенная методом лунок (диаметр лунки d=9 мм) в агаризованной среде, засеянной тест-организмом, составила 12-13 мм. Культура *Streptosporangium* OS/14 проявляла антибиотическую активность в отношении *Micrococcus luteus* только при глубинном культивировании на среде А4, диаметр зоны подавления роста, определенный методом лунок составил 11 мм.

К роду *Nonomuraea* были отнесены культуры OS/16 – OS/20. Культуры OS/16 и OS/17 были выделены из дерново-подзолистой почвы (образец №1), под номерами OS/18 – OS/20 из чернозема (образец №2). Культуральные и морфологические признаки культур актиномицетов рода *Nonomuraea*

представлены в таблице 11. Филогенетическое положение определено для культур, проявляющих антибиотическую активность (рис.12).

Таблица 11. Описание культур рода *Nonomuraea* при росте на агаровых средах.

Характер роста: + скудный, ++ хороший, +++ обильный рост.

Характеристики	Культуры рода <i>Nonomuraea</i>				
	OS/16	OS/17	OS/18	OS/19	OS/20
Рост на овсяной среде	+++	+++	+++	+++	+++
Рост на среде 2 Гаузе	+++	+++	+++	+++	+++
Цвет ВМ на овсяной среде	бежевый	белый, кремовый	белый, бежевый	белый, бежевый	белый, бежевый
Цвет ВМ на среде 2 Гаузе	слабый ВМ, светлофиолетовый	нет	нет	белый, бежевый	белый, бежевый
Цвет СМ на овсяной среде	светлобежевый				
Цвет СМ на среде 2 Гаузе	коричневый	светло коричневый	светло коричневый	светло коричневый	светло коричневый
Образование спор на ВМ	Цепочки спор в виде спиралей				
Образование растворимого пигмента	нет	нет	нет	нет	нет

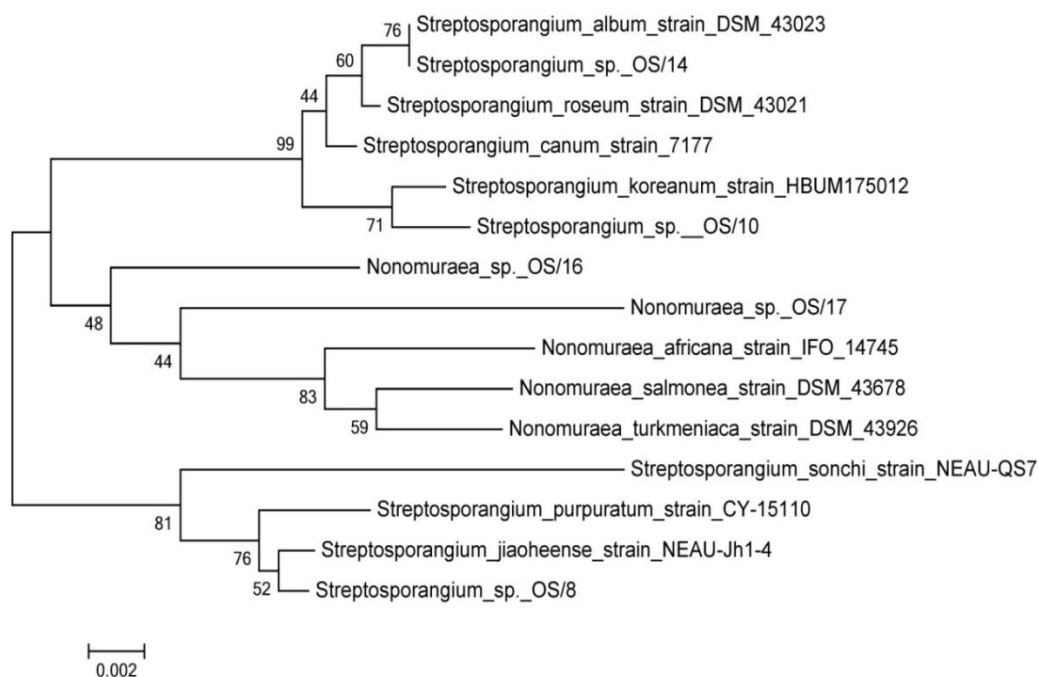


Рис. 12. Филогенетическое дерево культур родов *Streptosporangium* и *Nonomuraea*, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «neighbor-joining», масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

Культуры *Nonomuraea* sp. OS/17 и *Nonomuraea* sp. OS/16 проявляли антибиотическую активность в отношении грамположительных тест-микроорганизмов при глубинном культивировании на среде А4, остальные культуры данного рода не обладали антибиотической активностью.

Таблица 12. Антибиотическая активность культур рода *Nonomuraea* в динамике. Среда А4; диаметр лунки 9 мм.

Культуры рода <i>Nonomuraea</i>	Зоны подавления роста тест-микроорганизмов, мм														
	<i>S.aureus</i> ИНА 00985			<i>S.aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)			<i>S.aureus</i> ИНА 00762 (УФ-2)			<i>M. luteus</i> ATCC 9341			<i>B.subtilis</i> ATCC 6533		
	время, сут			время, сут			время, сут			время, сут			время, сут		
	3	5	7	3	5	7	3	5	7	3	5	7	3	5	7
OS/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	11	-	-	-
OS/17	11	11	-	11	11	11	19	19	14	13	13	11	-	-	11

### 6.2.3 Изучение культур актиномицетов семейства *Nocardiaceae*

Род *Nocardia* является членом семейства *Nocardiaceae* порядка *Corynebacteriales*. Многие представители этого рода были изолированы из клинического материала и являются возбудителями оппортунистических заболеваний человека и животных. Сапрофитным актиномицетам данного рода уделялось меньше внимания, хотя они широко распространены в почве [Golinska et al., 2013].

В нашей работе было выделено 13 культур – представителей рода *Nocardia*. Все культуры имели в гидролизатах клеточных стенок мезо-ДАПК, дифференцирующими сахарами являлись арабиноза и галактоза (IV тип клеточной стенки). Все изоляты формировали хорошо развитый субстратный мицелий, некоторые культуры формировали воздушный мицелий.

Выделенные культуры были разделены на две группы: культуры, которые образовывали воздушный мицелий на овсяной агаризованной среде, и культуры, которые не образовывали воздушный мицелий. Культуральные признаки нокардий, образующих ВМ, представлены в таблице 13. Филогенетическое положение нокардий представлено на рисунке 13.

Культуры актиномицетов рода *Nocardia* OS/26, OS/27, OS/31, OS/33 при росте на овсяном агаре и среде №2 Гаузе не образовывали воздушный мицелий или он был очень слабо развит. Рост на овсяном агаре - скудный, СМ бежевого цвета, ВМ слабо развит, белого или светлорозового цвета. Рост на среде №2 Гаузе хороший, СМ темнооранжевого цвета, ВМ – отсутствует.

Антибиотическая активность у выделенных культур рода *Nocardia* была изучена методом перпендикулярных штрихов и методом лунок при глубинном культивировании. Обнаружена антибиотическая активность в отношении *Micrococcus luteus* ATCC 9341 у культур *Nocardia* sp. OS/21, *Nocardia* sp. OS/29, *Nocardia* sp. OS/30, *Nocardia* sp. OS/32, *Nocardia* sp. OS/33; в отношении *Staphylococcus aureus* ИНА 00762 у культур *Nocardia* sp. OS/29, *Nocardia* sp.

OS/32; в отношении *Bacillus subtilis* ATCC 6633 у культуры *Nocardia* sp. OS/32; в отношении *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042 у культуры *Nocardia* sp. OS/28.

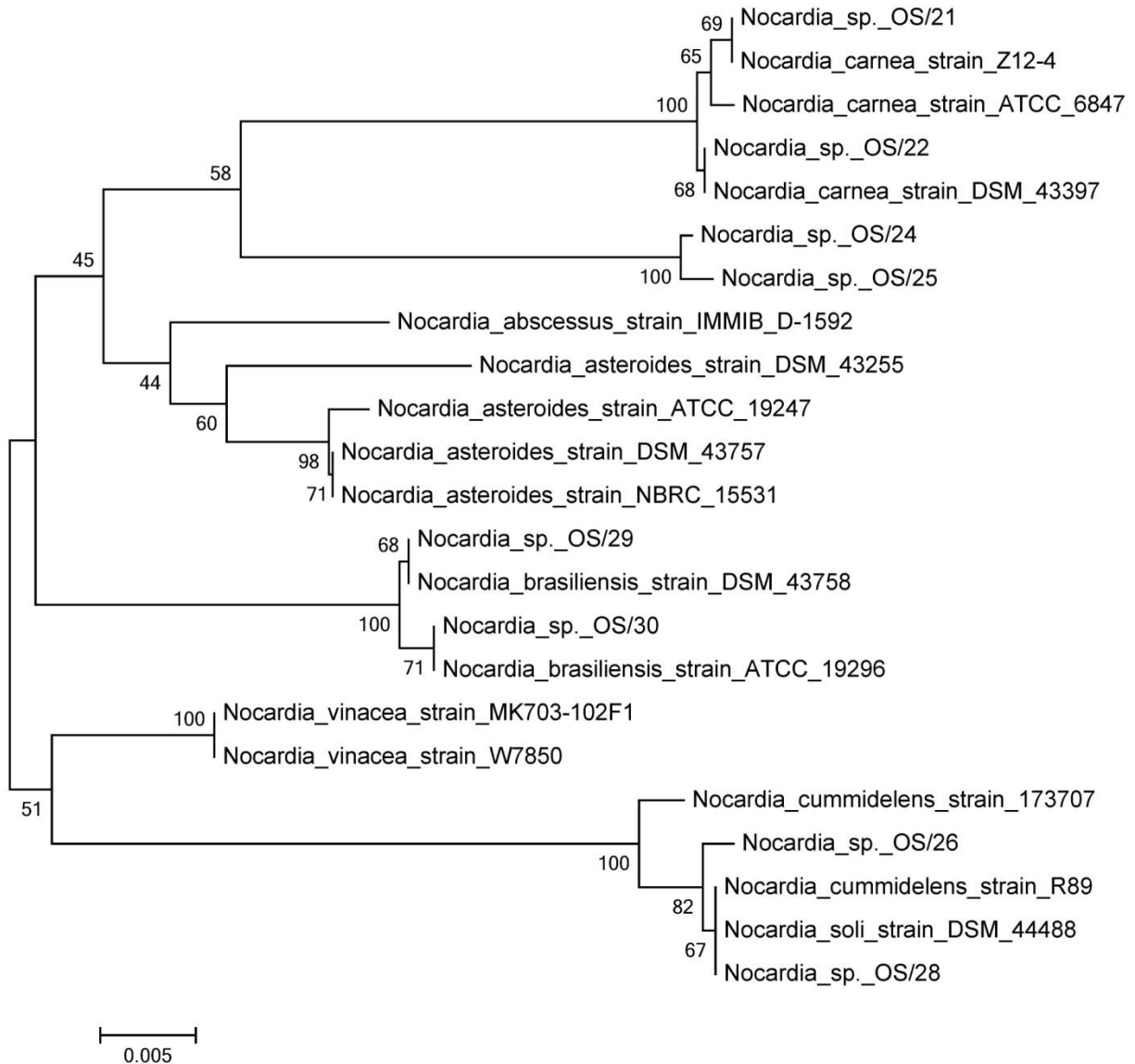


Рис. 13. Филогенетическое дерево почвенных культур рода *Nocardia*, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «neighbor-joining», масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

Таблица 13. Описание культур рода *Nocardia* при росте на агаровых средах. Характер роста: + скудный рост, ++ хороший рост, +++ обильный рост.

Характеристики	Культуры рода <i>Nocardia</i>								
	OS/21	OS/22	OS/23	OS/24	OS/25	OS/28	OS/29	OS/30	OS/32
Рост на овсяной среде	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Рост на среде 2 Гаузе	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Цвет ВМ на овсяной среде	белый	белый	белый	белый	белый	светло-розовый	светло-розовый	светло-розовый	светло-розовый
Цвет ВМ на среде 2 Гаузе	светло-розовый	светло-розовый	слабый ВМ, светло-оранжевый	светло-оранжевый	светло-оранжевый	светло-розовый	нет ВМ	Нет ВМ	слабый ВМ, светло-оранжевый
Цвет СМ на овсяной среде	бежевый	бежевый	бежевый	бежевый	бежевый	бежевый	бежевый	бежевый	бежевый
Цвет СМ на среде 2 Гаузе	бежевый	бежевый	бежевый	бежевый	бежевый	оранжевый	оранжевый	оранжевый	Темно-оранжевый
Образование спор на ВМ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Образование растворимого пигмента	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## 6.2.4 Изучение выделенных культур актиномицетов семейства

### *Thermomonosporaceae*

Семейство *Thermomonosporaceae* состоит из 4-х родов: *Actinocorallia*, *Actinomadura*, *Spirillospora* и *Thermomonospora*. Семейство включает мезофильные и термофильные актиномицеты, образующие подвижные или неподвижные споры, как одиночные, так и собранные в цепочки. Все представители семейства содержат в клеточных гидролизатах мезо-ДАПК [Kroppenstedt, 2006].

В проведенных опытах было выделено 8 культур, отнесенных к роду *Actinomadura*. Штаммы OS/34, OS/35, OS/36, OS/37 были выделены из образца дерново – подзолистой почвы, OS/38, OS/39, OS/40, OS/41 – из образца чернозема. Культура под номером OS/42, выделенная из образца чернозема, отнесена к роду *Actinocorallia*. Филогенетическое положение выделенных культур родов *Actinomadura* и *Actinocorallia* представлено на рисунке 14.

У всех культур в гидролизатах клеточных стенок обнаруживалась мезо-ДАПК. Культуры рода *Actinomadura* содержали в клеточных стенках сахар мадуросу (ШВ тип клеточной стенки); культура, отнесенная к роду *Actinocorallia*, не содержала диагностических сахаров (ШС тип клеточной стенки).

Культуральные и морфологические признаки при росте на агаровых средах штамма *Actinocorallia* sp.OS/42:

#### 1) Овсяный агар.

Рост хороший. Формирует хорошо развитый субстратный и воздушный мицелий. Цвет воздушного мицелия от белого до светло-розового. Растворимого пигмента нет. Цвет субстратного мицелия светло-серый до бесцветного. На ВМ формируются споры, собранные в длинные цепочки, более 8 спор в каждой. 2)

#### 2) Органическая среда 2 Гаузе.

Формирует хорошо развитый субстратный и воздушный мицелий. Цвет воздушного мицелия от белого до светло-розового. Растворимого пигмента нет.

Цвет субстратного мицелия светло-бежевый до бежевого. На ВМ формируются споры, собранные в длинные цепочки, более 8 спор в каждой.

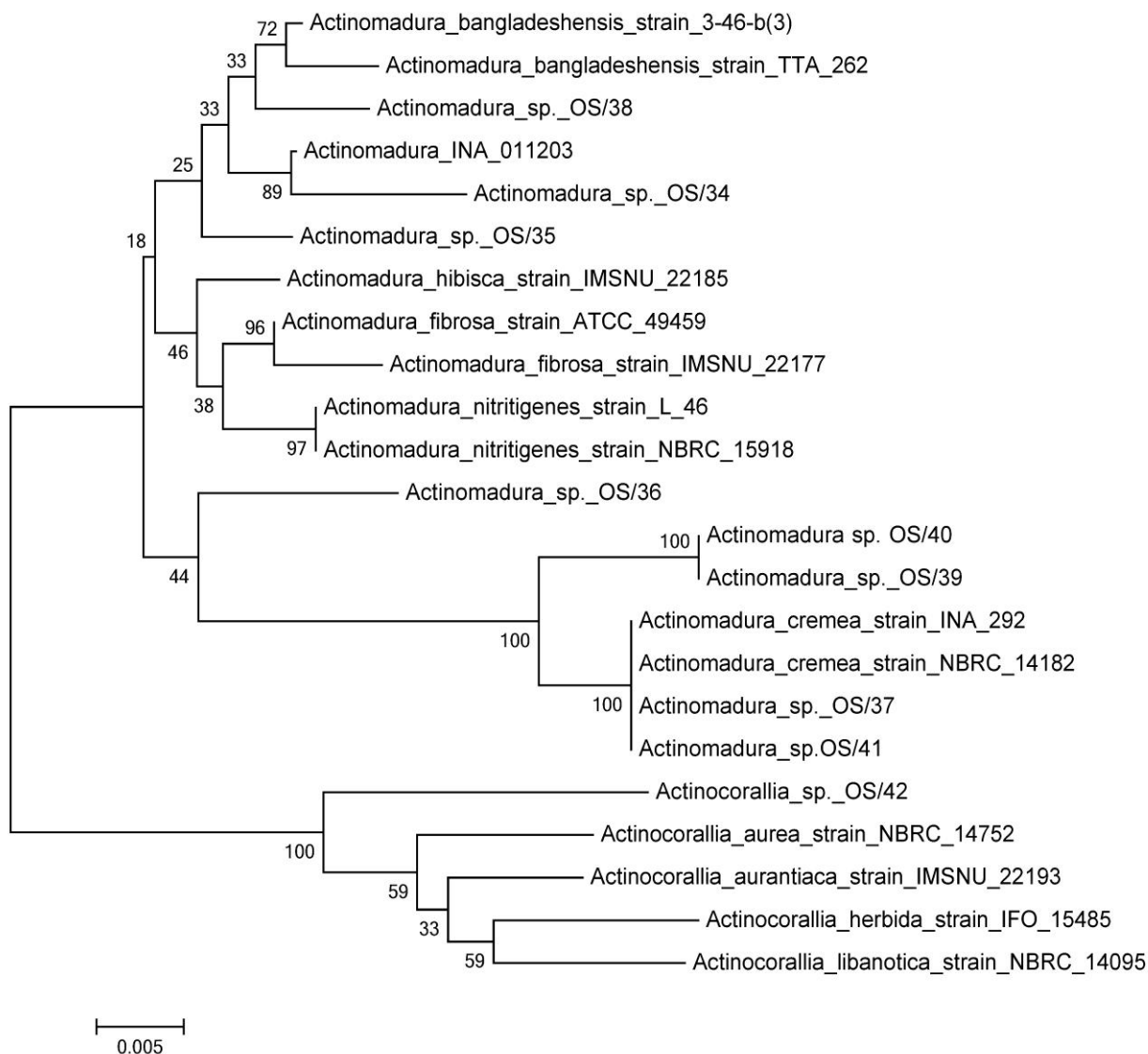


Рис. 14. Филогенетическое дерево почвенных культур семейства *Thermomonosporaceae*, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «neighbor-joining», масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

Антибиотическая активность в отношении тест-микроорганизмов у выделенной культуры *Actinocorallia* sp.OS/42 не обнаружена. Определение



антибиотической активности проводилось методом перпендикулярных штрихов и методом лунок, при выращивании культуры в жидких питательных средах на 3, 5, 7 и 10 сутки. На жидкой органической среде 2 Гаузе с мелом, среде 6613, сахарозной среде, среде 2663, среде А4, среде 5339 рост культуры был хороший, на среде 330 – культура не росла.

Описание культуральных признаков выделенных штаммов актиномицетов рода *Actinomadura* представлено в таблице 14.

Антибиотическая активность культур рода *Actinomadura*, определенная методом перпендикулярных штрихов, представлена в таблице 15. В отношении тест-организмов: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Saccharomyces cerevisiae* антибиотической активности не было обнаружено. При культивировании на жидких средах не удалось выявить антибиотическую активность в отношении тест-микроорганизмов у культуры *Actinomadura* sp. OS/38. Культура *Actinomadura* sp. OS/40 проявляла слабую активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus* (УФ) и *Micrococcus luteus*. Остальные культуры при выращивании на жидких питательных средах проявляли антибиотическую активность в отношении тех же самых тест-микроорганизмов, что и при росте на агаризованной среде №2 Гаузе.

Таблица 14. Описание культур рода *Actinomadura* при росте на агаровых средах. Характер роста: + скудный рост, ++ хороший рост, +++ обильный рост.

Характеристики	Культуры рода <i>Actinomadura</i>							
	OS/34	OS/35	OS/36	OS/37	OS/38	OS/39	OS/40	OS/41
Рост на овсяной среде	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Рост на среде 2 Гаузе	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Цвет ВМ на овсяной среде	белый	белый	бело-фиолетовый	белый	белый	светло-фиолетовый	белый	белый
Цвет ВМ на среде 2 Гаузе	белый	Слабый. Белый, светло-бежевый.	Нет ВМ	белый	белый	Образуется у некоторых клоний. Белый	Нет ВМ	белый
Цвет СМ на овсяной среде	светло-серый	светло-серый	светло-серый	светло-серый	светло-серый	светло-серый	светло-серый	светло-серый
Цвет СМ на среде 2 Гаузе	бежевый	бежевый	фиолетовый	бежевый	бежевый	светлофиолетовый	бежевый	бежевый
Образование спор на ВМ	+	+	+	+	+	+	+	+
Образование растворимого пигмента	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 15. Антибиотическая активность культур рода *Actinomadura* по отношению к грамположительным тест-микроорганизмам

Штаммы рода <i>Actinomadura</i>	Антибиотическая активность в отношении тест-микроорганизмов (зоны подавления роста, мм);				
	<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00985	<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00762 (УФ-2)	<i>Micrococcus luteus</i> АТСС 9341	<i>Bacillus subtilis</i> АТСС 6533
<i>Actinomadura</i> sp. OS/34	-	-	-	5	5
<i>Actinomadura</i> sp. OS/35	-	-	-	5	-
<i>Actinomadura</i> sp. OS/36	10	10	15	5	5
<i>Actinomadura</i> sp. OS/37	10	10	10	10	-
<i>Actinomadura</i> sp. OS/38	-	-	-	-	-
<i>Actinomadura</i> sp. OS/39	5	-	5	5	-
<i>Actinomadura</i> sp. OS/40	-	-	-	5	-
<i>Actinomadura</i> sp. OS/41	5	5	5	-	-

### 6.2.5 Изучение культур актиномицетов семейства *Pseudonocardiaceae*

Среди выделенных культур к семейству *Pseudonocardiaceae* было отнесено 11 культур: 5 культур принадлежали к роду *Pseudonocardia*, 4 культуры к роду *Amycolatopsis*, 1 культура - к роду *Saccharomonospora* и 1 культура – к роду *Saccharopolyspora*. Все выделенные культуры имели IV тип клеточной стенки, т.е. содержали в гидролизатах клеточных стенок мезо-ДАПК, арабинозу и галактозу в качестве диагностических сахаров.

К роду *Pseudonocardia* были отнесены культуры OS/43 – OS/47. Из образца дерново – подзолистой почвы было выделено 4 культуры OS/43 – OS/46 и одна культура OS/47 была выделена из образца чернозема. Филогенетическое положение выделенных культур актиномицетов рода *Pseudonocardia* представлено на рисунке 15, культуральные признаки выделенных актиномицетов - представителей рода *Pseudonocardia* описаны в таблице 16.

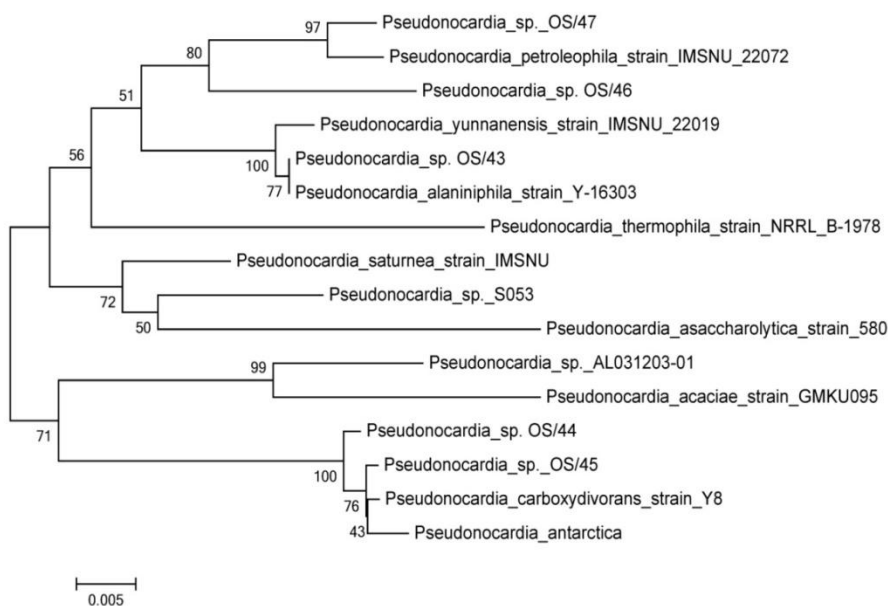


Рис. 15. Филогенетическое дерево почвенных культур актиномицетов рода *Pseudonocardia*, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «neighbor-joining», масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов

Таблица 16. Описание культур рода *Pseudonocardia* при росте на агаровых средах.

Характер роста: + скудный рост, ++ хороший рост, +++ обильный рост.

Характеристики	Культуры рода <i>Pseudonocardia</i>				
	OS/43	OS/44	OS/45	OS/46	OS/47
Рост на овсяной среде	+++	+++	+++	+++	+++
Рост на среде 2 Гаузе	+++	+++	+++	+++	+++
Цвет ВМ на овсяной среде	светло-розовый	белый	белый, светло-розовый	белый	белый
Цвет ВМ на среде 2 Гаузе	светло-розовый (слабый)	белый	бежевый	нет	нет
Цвет СМ на овсяной среде	бежевый	бежевый	бежевый	бежевый	бежевый
Цвет СМ на среде 2 Гаузе	коричневый	коричневый	коричневый	желтый	бежевый
Образование спор на ВМ	+	+	+	+	+
Образование растворимого пигмента	-	-	-	-	-

Антибиотической активностью в отношении *Staphylococcus aureus* ИНА 00985, *Staphylococcus aureus* ИНА 00762 (УФ-2), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 обладали культуры OS/44 и OS/45. Зоны подавления роста тест-микроорганизмов, определенные методом перпендикулярного штриха, представлены в таблице 17 Антибиотической активности в отношении других тест-микроорганизмов при культивировании на жидких средах (жидкая органическая среда №2 Гаузе с мелом, среда 6613, среда сахарозная, среда 2663, среда А4, среда 5339, среда 330) выявлено не было. Рост культуры OS/44 на жидкой среде 2663 был очень слабым.

Таблица 17. Антибиотическая активность культур рода *Pseudonocardia* по отношению к грамположительным тест-микроорганизмам.

Штаммы рода <i>Pseudonocardia</i>	Антибиотическая активность в отношении тест-микроорганизмов (зоны подавления, мм)		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00985	<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00762 (УФ-2)	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341
<i>Pseudonocardia</i> OS/44	2	10	10
<i>Pseudonocardia</i> OS/45	10	2	3

К роду *Amycolatopsis* было отнесено 4 культуры под номерами OS/48-OS/51, все культуры были выделены из образца дерново – подзолистой почвы. Культуральные признаки представлены в таблице 18, Филогенетическое положение культур рода *Amycolatopsis* представлено на рисунке 16.

Таблица 18. Описание культур рода *Amycolatopsis* при росте на агаровых средах. Характер роста: + скудный рост, ++ хороший рост, +++ обильный рост.

Характеристики	Культуры рода <i>Amycolatopsis</i>			
	OS/48	OS/49	OS/50	OS/51
Рост на овсяной среде	+++	+++	+++	+++
Рост на среде 2 Гаузе	+++	+++	+++	+++
Цвет ВМ на овсяной среде	белый	белый	белый	белый
Цвет ВМ на среде 2 Гаузе	нет ВМ	нет ВМ	нет ВМ	белый
Цвет СМ на овсяной среде	светлосерый	светлосерый	светлосерый	светлосерый
Цвет СМ на среде 2 Гаузе	коричневый	бежевый	бежевый	бежевый
Образование спор на ВМ	+	+	+	+
Образование растворимого пигмента	-	-	-	-

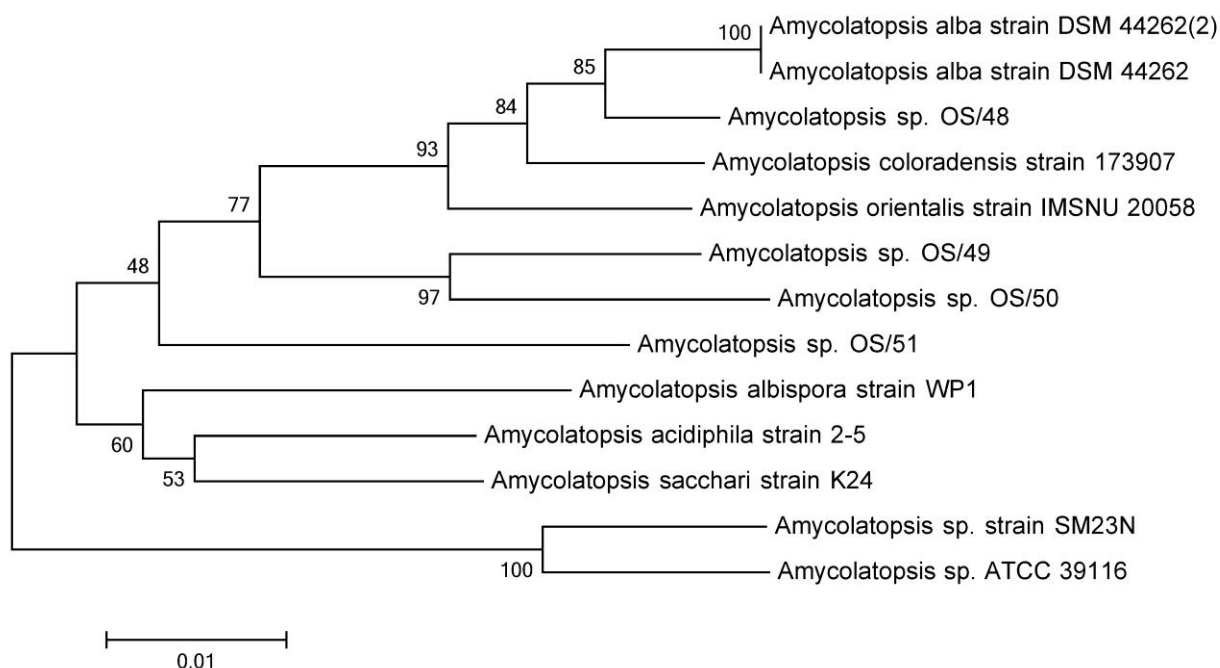


Рис. 16. Филогенетическое дерево почвенных культур актиномицетов рода *Amycolatopsis*, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «neighbor-joining», масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов

Культура OS/56 была выделена из образца чернозема и отнесена к роду *Saccharopolyspora*. Рост на твердых питательных средах:

1) Овсяный агар.

Формирует хорошо развитый субстратный и воздушный мицелий. Цвет воздушного мицелия белый. На ВМ образуются цепочки округлых спор. Растворимого пигмента нет. Цвет субстратного мицелия желтовато-бурый.

2) Органическая среда 2 Гаузе.

Формирует хорошо развитый субстратный мицелий. Цвет субстратного мицелия от бежевого до бурого. ВМ не формируется. Растворимого пигмента нет.

Определение антибиотической активности в отношении тест-организмов методом перпендикулярных штрихов показало, что культура *Saccharopolyspora* OS/56 не проявляет антагонистических свойств в отношении исследуемых тест-микроорганизмов. Однако проверка антибиотической активности методом агаровых лунок при культивировании *Saccharopolyspora* OS/56 в жидких средах показала, что культура проявляет антибиотическую активность при культивировании на жидких средах - сахарозная, среда 330 и среда 2663 в отношении *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042. Филогенетическое положение выделенной культуры представлено на рисунке 17.

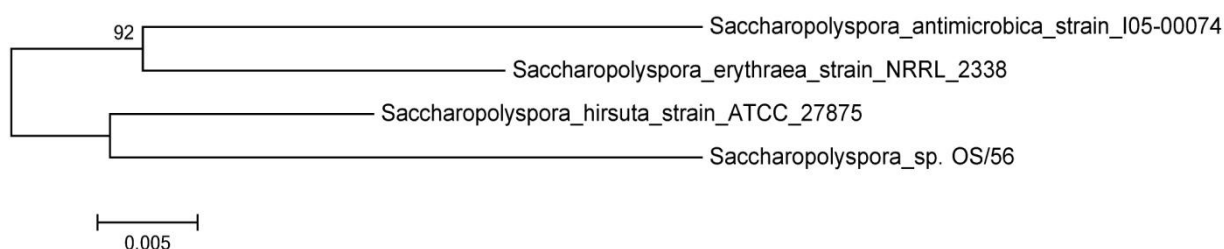


Рис. 17. Филогенетическое дерево почвенных культур актиномицетов рода *Saccharopolyspora*, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «neighbor-joining», масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов

Культура OS/57 была выделена из образца чернозема и отнесена к роду *Saccharomonospora* (рис.18). Рост на твердых питательных средах:

1) Овсяный агар.

Рост хороший. Формирует хорошо развитый субстратный и воздушный мицелий. Цвет воздушного мицелия от белого до зеленовато-бежевого. Растворимого пигмента нет. Цвет субстратного мицелия оливково-зеленый. На ВМ формируются одиночные споры.

2) Органическая среда 2 Гаузе.

Рост хороший. Формирует хорошо развитый субстратный и воздушный мицелий. Цвет воздушного мицелия от белого до бежевого. Растворимого



пигмента нет. Цвет субстратного мицелия синезеленый. На ВМ формируются одиночные споры.

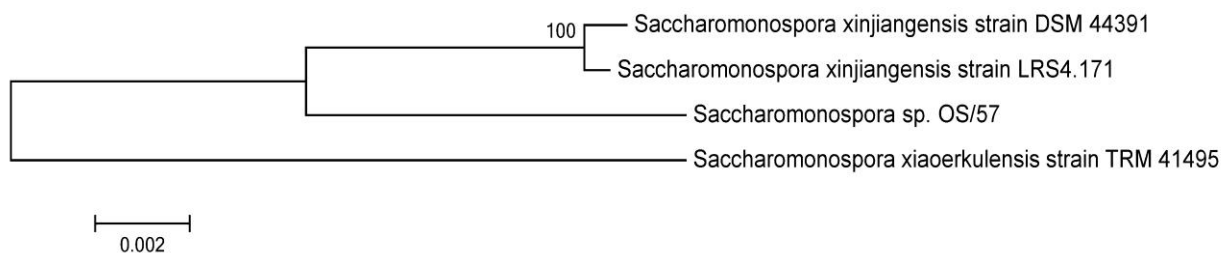


Рис. 18. Филогенетическое дерево почвенных культур актиномицетов рода *Saccharomonospora*, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «neighbor-joining», масштаб соответствует 2-м нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

Антибиотическая активность у *Saccharomonospora* OS/57 обнаружена в отношении тест-организмов: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762 (УФ-2) и *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042. Определение антибиотической активности проводилось методом перпендикулярных штрихов, зоны подавления роста имели следующие значения: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 - 5 мм, *Staphylococcus aureus* ИНА 00762 - 10 мм, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042 – 5 мм. При культивировании на жидких средах и определении антибиотической активности методом лунок нами были получены следующие результаты:

1. Жидкая органическая среда №2 Гаузе с мелом: рост хороший, антибиотическая активность обнаружена в отношении *Staphylococcus aureus* ИНА 00985, *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042 и *Micrococcus luteus* ATCC 934
2. Среда 6613, 2663, 5339: рост скудный, антибиотической активности в отношении тест-организмов не обнаружено.

3. Среды А4, сахарозная, 330: рост хороший, антибиотическая активность обнаружена в отношении *Staphylococcus aureus* ИНА 00985, *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042

### 6.2.6 Изучение культур актиномицетов семейства *Promicrosporaceae*

В работе было выделено 3 культуры OS/53-OS/55, отнесенные к семейству *Promicromonosporaceae*. Культура *Promicromonospora* sp. OS/53 была выделена из образца дерново – поздолистой почвы, культуры *Promicromonospora* sp. OS/54 и *Promicromonospora* sp. OS/55 - из образца чернозема. У всех культур не были обнаружены изомеры ДАПК, в качестве сахаров в клетках присутствовали галактоза и глюкоза.

Выделенные культуры актиномицетов рода *Promicromonospora* обладали сходными культуральными и морфологическими характеристиками:

1. хорошим ростом на среде 2 Гаузе и овсяном агаре;
2. субстратный мицелий был хорошо развит и распадался на фрагменты коккоидной, бациллярной и V – образной формы;
3. цвет СМ от белого до желтого;

Культуры актиномицетов рода *Promicromonospora* OS/53 и OS/54 не образовывали воздушный мицелий на овсяной среде и среде 2 Гаузе. У культуры OS/55 наблюдалось образование слабо развитого воздушного мицелия белого цвета при росте на овсяном агаре. Филогенетическое положение выделенных культур представлено на рисунке 19.

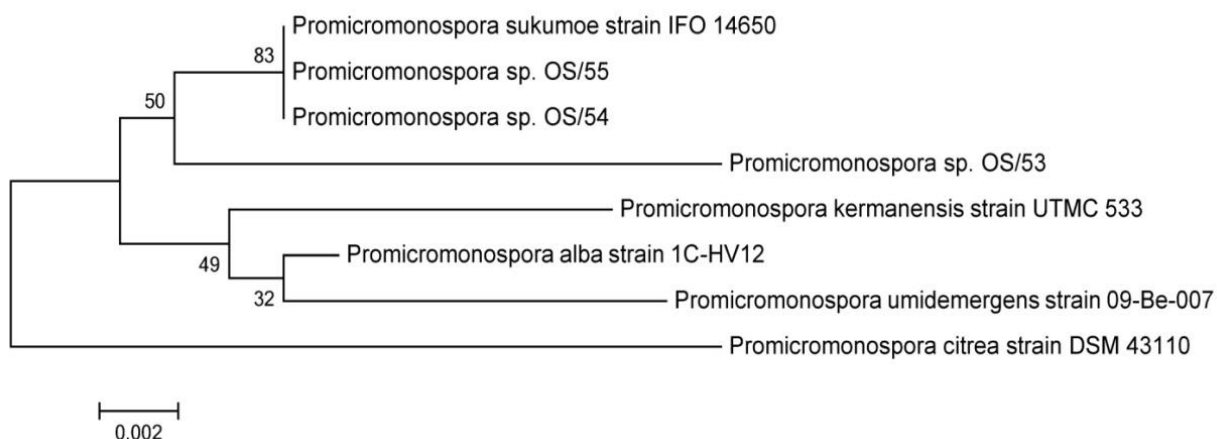


Рис. 19. Филогенетическое дерево культур актиномицетов рода *Promicromonospora*, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «neighbor-joining», масштаб соответствует 2-м нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

Определение антибиотической активности в отношении тест-микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов на агаризованной среде 2 Гаузе показало, что только одна культура - *Promicromonospora* sp. OS/53 проявляет активность в отношении *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042, в отношении других тест-микроорганизмов данная культура была неактивна. Выращивание культур рода *Promicromonospora* в жидких средах и определение антибиотической активности методом агаровых лунок не выявило антибиотической активности в отношении тест-микроорганизмов.

### 6.2.7 Изучение выделенной культуры рода *Kribbella*

Род *Kribbella* относится к семейству *Nocardioideae*. В наших исследованиях была выделена одна культура OS/52, отнесенная к роду *Kribbella*. Данная культура имела I тип клеточной стенки (LL-диаминопимелиновая кислота и отсутствие дифференцирующих сахаров).

Морфологические и культуральные признаки выделенной культуры *Kribbella* sp. OS/52 при росте на агаризованных средах:

1) овсяный агар:

Формируется хорошо развитый субстратный и воздушный мицелий. Цвет воздушного мицелия белый. На ВМ нет спорообразования, с возрастом ВМ фрагментируются на палочковидные элементы. Растворимого пигмента нет. Цвет субстратного мицелия кремовый. СМ фрагментируется на неправильные палочковидные элементы.

2) органическая среда 2 Гаузе:

Формируется хорошо развитый субстратный мицелий. Цвет субстратного мицелия бежевый. Субстратный мицелий фрагментируется на неправильные палочковидные элементы (рис 20) . ВМ не формируется. Растворимого пигмента нет.

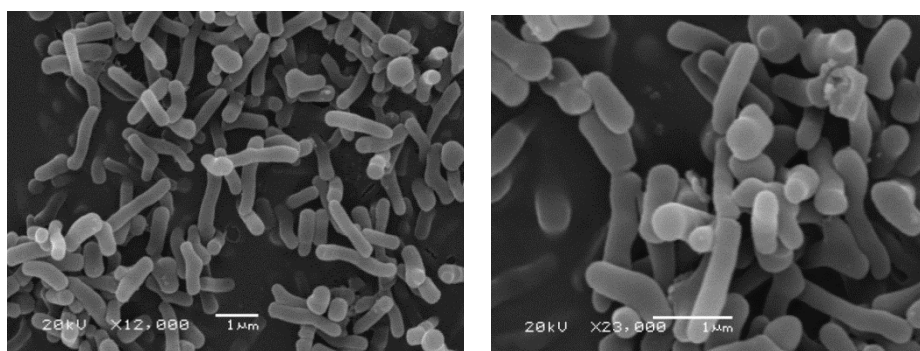


Рис.20 Электронная фотография *Kribbella* sp. OS/52. Субстратный мицелий при росте на среде 2 Гаузе.

Культура *Kribbella* sp. OS/52 проявляла антибиотическую активность в отношении следующих тест-микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Филогенетическое положение выделенной культуры представлено на рисунке 21.

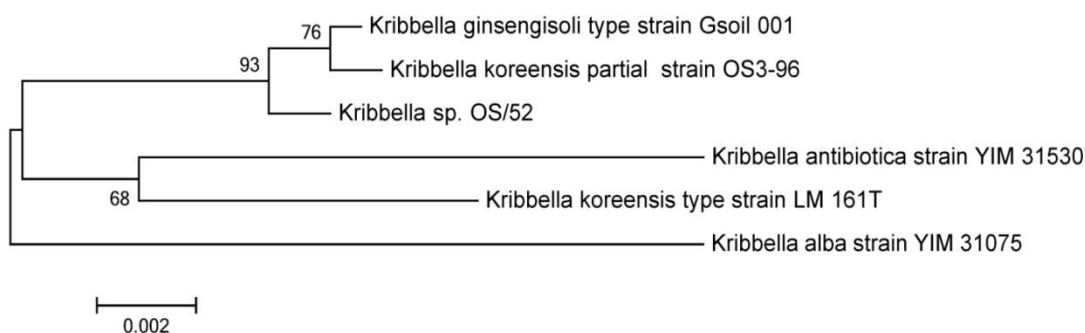


Рис. 21. Филогенетическое дерево культуры актиномицета рода *Kribbella*, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Дендрограмма построена с помощью алгоритма «neighbor-joining», масштаб соответствует 2-м нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

Изучение морфологических, культуральных, хемотаксономических и геносистематических признаков выделенных культур актиномицетов редких родов показало, что данные культуры относятся к следующим родам: *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinocorallia*, *Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Promicromonospora*, *Kribbella*. Преобладающее количество выделенных актиномицетов принадлежало к роду *Micromonospora*.

### 6.3 Изучение выделенных культур актиномицетов рода *Streptomyces*

Для сравнения влияния низкотемпературного хранения на культуры актиномицетов редких родов и широко распространенных культур рода *Streptomyces*, нами предварительно было проведено изучение 9 культур стрептомицетов, выделенных в опытах с добавлением сока алоэ, и определена антибиотическая активность данных культур в отношении тест-микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов (табл. 19,20). Выделенные культуры были отнесены на основании морфологических, фенотипических и

геносистематических признаков к следующим видам: *Streptomyces libani* (INA 01191), *Streptomyces chrestomyceticus* (INA 01192), *Streptomyces aurantiacus* (INA 01193), *Streptomyces nigrescens* (INA 01194), *Streptomyces canus* (INA 01195), *Streptomyces glycovorans* (INA 01196), *Streptomyces ederensis* (INA 01197), *Streptomyces albogriseolus* (INA 01198), *Streptomyces hygrosopicus* (INA 01199) (рис. 22). Культуры стрептомицетов обладали активным ростом на овсяной агаризованной среде и формировали воздушный мицелий с образованием цепочек спор.

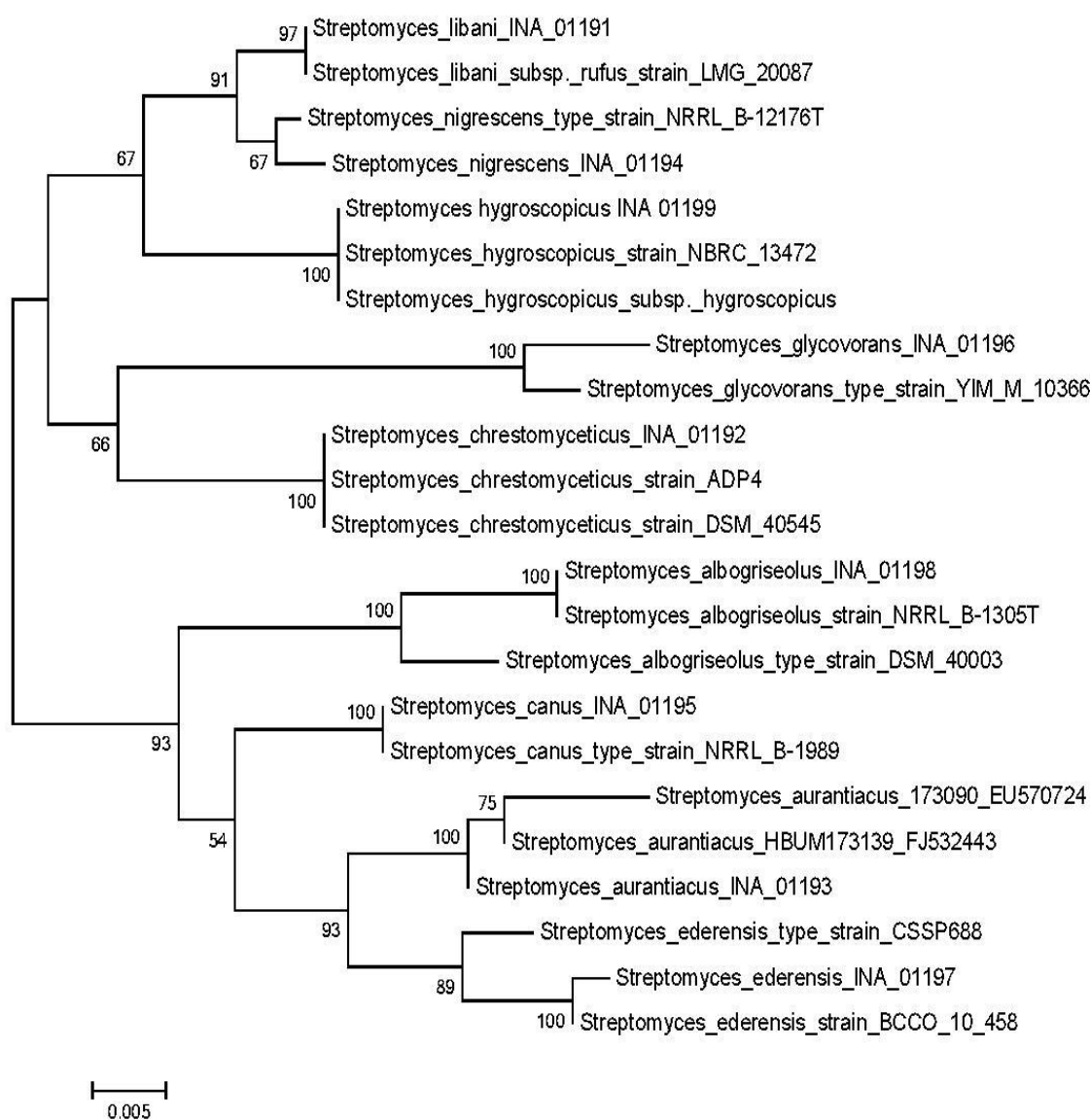


Рис. 22. Филогенетическое дерево актиномицетов рода *Streptomyces*, основанное на сиквенс-анализе нуклеотидных последовательностей 16S рРНК. Масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

Таблица 19. Антибиотическая активность актиномицетов *Streptomyces libani* INA 01191, *Streptomyces auranticus* INA 01193, *Streptomyces chrestomyceticus* INA 01192, *Streptomyces nigrescens* INA 01194 в отношении тест-организмов.

Тест-организм	Антибиотическая активность (зона подавления роста, мм)			
	<i>Str.libani</i> INA 01191	<i>Str.aurantiacus</i> INA 01193	<i>Str.chrestomyceticus</i> INA 01192	<i>Str.nigrescens</i> INA 01194
<i>S.aureus</i> ИНА 00985 (209P)	5	-	-	-
<i>S.aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> ИНА 00762 (209P/УФ-2)	-	-	-	-
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	8	18	35	10
<i>B.subtilis</i> ATCC 6533	-	-	-	-
<i>E.coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-
<i>Sac.cerevisiae</i> ИНА 01042	-	20	-	-

Примечание. « - » отсутствие зоны подавления тест-организма.

Таблица 20. Антибиотическая активность актиномицетов *Streptomyces canus* INA 01195, *Streptomyces glycovorans* INA 01196, *Streptomyces ederensis* INA 01197, *Streptomyces albogriseolus* INA 01198, *Streptomyces hygroscopicus* INA 01199 в отношении тест-организмов.

Тест-организм	Антибиотическая активность (зона подавления роста, мм)				
	<i>Str. canus</i> INA 01195	<i>Str. glycovorans</i> INA 01196	<i>Str. ederensis</i> INA 01197	<i>Str. albogriseolus</i> INA 01198	<i>Str. hygroscopicus</i> INA 01199
<i>S. aureus</i> ИНА 00985 (209P)	5	20	5	3	20
<i>S. aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	-	10	11	3	20
<i>S. aureus</i> ИНА 00762 (209P/УФ-2)	-	3	12	14	20
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	12	15	8	-	> 25
<i>B. subtilis</i> ATCC 6533	-	5	8	15	5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	8	-	5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	3	-	-
<i>Sac. cerevisiae</i> ИНА 01042	-	-	-	10	10

Примечание. « - » отсутствие зоны подавления тест-организма.



Таким образом, из 9 выделенных культур актиномицетов рода *Streptomyces*, активность в отношении грамположительных тест микроорганизмов проявляли все 9 культур, в отношении грамотрицательных - 2 культуры, в отношении *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042 – 3 культуры.

#### **6.4 Изучение влияния сока алоэ на антибиотическую активность выделенных актиномицетов редких родов**

В наших исследованиях было показано, что сок алоэ оказывает стимулирующее действие на выделение актиномицетов из почвы. Из литературных данных известно, что вещества, которые стимулировали выделение актиномицетов, также оказывали положительное влияние на биосинтез антибиотиков [Куликова, 2017].

Следующим этапом изучения действия сока алоэ было исследование его действия в различных концентрациях на антибиотическую активность актиномицетов. Для сравнения действия нескольких факторов на антибиотическую активность выделенных актиномицетов применяли синтетический адреналин в концентрации 0,5; 1,0; 1,5 мгк/мл; сок алоэ древовидного в концентрациях: 5%, 10%.

В литературе описаны методы совместного культивирования микроорганизма-продуцента и микроорганизма – патогена, в результате применения которых наблюдалось увеличение синтеза биологически активных веществ [Naque et al., 2015, Oh et al, 2005]. В наших исследованиях для совместного культивирования использовались тест-микроорганизмы *Staphylococcus aureus* ИНА 00762 (инактивированные автоклавированием) и *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (живые и инактивированные).

Для экспериментов были отобраны следующие культуры актиномицетов: *Nocardia* sp. OS/21, *Nonomuraea* sp. OS/17, *Nonomuraea* sp. OS/19, *Actinomadura* sp. OS/37, *Actinomadura* sp. OS/40, *Kribbella* sp. OS/32. Данные культуры были

выделены с использованием сока алоэ и обладали антибиотической активностью в отношении тест-микроорганизмов *Staphylococcus aureus* ИНА 00762 и/или *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Для сравнения действия веществ, увеличивающих синтез антибиотиков, были использованы также коллекционные культуры актиномицетов: *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *Nonomuraea roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06. Посевной материал выращивали в колбах Эрленмейера с жидкой питательной средой А4 при температуре 28<sup>0</sup>С в течение 7 суток. После достижения стационарной фазы роста культуры актиномицетов пересеивали в свежую питательную среду А4, в которую вносили исследуемые вещества или тест-микроорганизмы. Пробы отбирались на 3, 5 и 7 сутки роста.

Результаты показали, что адреналин не оказывает стимулирующего действия ни на образование биологически активных веществ, ни на рост актиномицетов. Во всех вариантах опыта рост культур и антибиотикообразование были стандартными и не отличались от контроля.

Внесение инактивированных клеток *Staphylococcus aureus* ИНА 00762 и *Micrococcus luteus* ATCC 9341 также не оказало влияния на рост актиномицетов и антибиотикообразование.

Результаты совместного культивирования актиномицетов и живых клеток тест-культуры *Micrococcus luteus* и результаты культивирования актиномицетов с добавлением сока алоэ в концентрации 10% представлены в таблице 21.

Внесение в питательную среду сока алоэ в концентрации 5% не оказало влияния на антибиотическую активность исследуемых актиномицетов.

Культивирование *Micrococcus luteus* совместно с актиномицетами *Nocardia* sp. OS/21, *Nonomuraea* sp. OS/17, *Nonomuraea* sp. OS/19, *Actinomadura* sp. OS/37, *Actinomadura* sp. OS/40, *Kribbella* sp. OS/32 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06 выявило увеличение зоны подавления роста тест-микроорганизмов, более раннее начало синтеза антибиотика или увеличение времени синтеза антибиотика.

Внесение сока алоэ в питательную среду в концентрации 10% оказывало положительно влияние на синтез антибиотиков у культур актиномицетов

*Nocardia* sp. OS/21, *Nonomuraea* sp. OS/17, *Nonomuraea* sp. OS/19, *Actinomadura* sp. OS/37, *Actinomadura* sp. OS/40, *Kribbella* sp. OS/32.

Не было отмечено увеличения антибиотической активности у коллекционных штаммов *Str.hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup> и *Nonomuraea roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281.

Наибольшее влияние сока алоэ на антибиотическую активность было выявлено при культивировании актиномицетов *Nonomuraea* sp. OS/17 и *Actinomadura* sp. OS/37 в среде с добавлением 10% сока алоэ.

Таким образом, внесение сока алоэ в концентрации 10% в жидкие питательные среды может стимулировать рост и антибиотикообразование у редких культур актиномицетов

Таблица 21. Антибиотическая активность культур актиномицетов в динамике: 1-контроль, 2- внесение живой культуры *Micrococcus luteus*, 3 – добавление 10% сока алоэ.

Культуры актиномицетов		Зоны подавления роста тест-микроорганизмов, мм																				
		<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00985 (209P)			<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)			<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00762 (209P/УФ-2)			<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341			<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6533			<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ИНА 01042		
		время, сут.			время, сут.			время, сут.			время, сут.			время, сут.			время, сут.					
		3	5	7	3	5	7	3	5	7	3	5	7	3	5	7	3	5	7	3	5	7
<i>Nocardia</i> sp. OS/21	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	14	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	14	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nonomuraea</i> sp. OS/17	1	11	11	-	11	10	10	21	18	15	13	13	11	-	-	10	-	-	-	-	-	-
	2	11	13	12	14	14	11	21	19	16	13	15	11	-	-	10	-	-	-	-	-	-
	3	14	16	14	15	15	12	23	24	24	15	15	15	13	15	15	-	-	-	-	-	-
<i>Actinomadura</i> sp. OS/37	1	12	15	15	-	12	12	10	12	-	14	15	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	14	16	16	-	12	12	10	12	12	16	18	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	16	18	18	-	12	12	11	13	12	17	20	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinomadura</i> sp. OS/40	1	10	12	10	-	-	-	10	-	-	11	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	10	14	16	-	10	10	10	-	-	11	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	10	12	12	-	10	10	10	-	-	11	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kribbella</i> sp. OS/32	1	-	10	10	-	10	10	18	25	22	11	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	10	11	11	-	10	10	20	25	22	11	11	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	10	11	11	-	10	10	20	26	23	11	11	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.hygroscopicus</i> RIA 1433 <sup>T</sup>	1	25	25	25	22	25	25	26	26	26	25	25	25	18	18	18	15	15	15	20	20	20
	2	25	25	25	22	25	25	26	26	26	24	25	25	18	18	18	15	15	15	20	20	20
	3	25	25	25	22	25	25	26	26	26	24	26	25	18	18	18	15	15	15	20	20	20
<i>Nonomuraea roseoviolaceae</i> subsp. <i>carminata</i> INA 4281	1	16	18	18	15	18	18	20	24	24	20	24	23	12	14	14	-	-	-	-	-	-
	2	16	18	18	16	18	18	20	24	24	20	24	24	12	14	14	-	-	-	-	-	-
	3	16	18	18	16	18	18	20	24	24	20	24	24	12	14	14	-	-	-	-	-	-
<i>Streptosporangium</i> sp. INA 34-06	1	12	12	14	10	10	12	12	13	16	12	14	16	10	12	12	-	-	-	-	-	-
	2	12	14	16	10	10	12	12	13	16	14	14	16	10	12	12	-	-	-	-	-	-
	3	12	14	16	10	10	12	12	13	16	12	14	16	10	12	12	-	-	-	-	-	-

## 6.5 Хранение выделенных культур актиномицетов редких родов методом низкотемпературного замораживания

Наши исследования в области хранения коллекционных культур актиномицетов (*Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *N. roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06) показали, что данные культуры обладают высокой жизнеспособностью при хранении в условиях низких температур -70<sup>0</sup>C как в присутствии криопротектора, так и без него.

Для изучения выживаемости актиномицетов при длительном хранении при температуре -70<sup>0</sup>C нами были использованы следующие культуры: *Streptosporangium* sp. OS/7 – OS/15, *Nonomuraea* sp. OS/16 – OS/20, *Nocardia* OS/21- OS/25, OS/28-OS/30 и OS/32, *Actinomadura* OS/34 – OS/41, *Actinocorallia* sp. OS/42, *Pseudonocardia* sp. OS/43 – OS/47, *Amycolatopsis* sp. OS/48-OS/51, *Saccharopolyspora* sp. OS/56 и культура *Saccharomonospora* sp. OS/57. Данные культуры хорошо росли на овсяной агаризованной среде и образовывали воздушный мицелий, формирующий споры.

Для сравнения влияния низкотемпературного хранения на культуры актиномицетов редких родов и широко распространенных культур рода *Streptomyces*, культуры актиномицетов редких родов были одновременно заложены на хранение с выделенными культурами стрептомицетов: *Streptomyces libani* (INA 01191), *Streptomyces chrestomyceticus* (INA 01192), *Streptomyces aurantiacus* (INA 01193), *Streptomyces nigrescens* (INA 01194), *Streptomyces canus* (INA 01195), *Streptomyces glycovorans* (INA 01196), *Streptomyces ederensis* (INA 01197), *Streptomyces albogriseolus* (INA 01198), *Streptomyces hygrosopicus* (INA 01199).

Актиномицеты были заложены на хранение в виде споровых суспензий. Хранение осуществлялось в течение 3-х лет. Выживаемость актиномицетов оценивалась по количеству колоний, выросших на чашках Петри с агаризованной средой №2 Гаузе. Также была проведена оценка антибиотической активности выросших колоний.

В результате проведенных исследований установлено, что споры стрептомицетов, суспендированные в дистиллированной воде в концентрации  $10^7$  –  $10^8$  КОЕ/мл, хорошо переносят процесс низкотемпературного замораживания с последующим оттаиванием при комнатной температуре. Выживаемость культур стрептомицетов составила 93-97%. Выживаемость культур стрептомицетов в вариантах без использования криопротектора, так и с применением 10% раствора глицерина, на протяжении всего периода хранения оставалась на одном уровне.

Жизнеспособность культур актиномицетов редких родов также была на высоком уровне. На рисунке 23 представлены усредненные данные (по родам актиномицетов) по количеству выживших КОЕ после 3-х лет хранения в процентах относительно контроля (количество КОЕ до замораживания). Полученные результаты показали, что выживаемость исследуемых актиномицетов в течение всего периода хранения была на высоком уровне, т.е. более 90% клеток сохраняло жизнеспособность как с использованием криопротектора (10% раствора глицерина), так и без него.

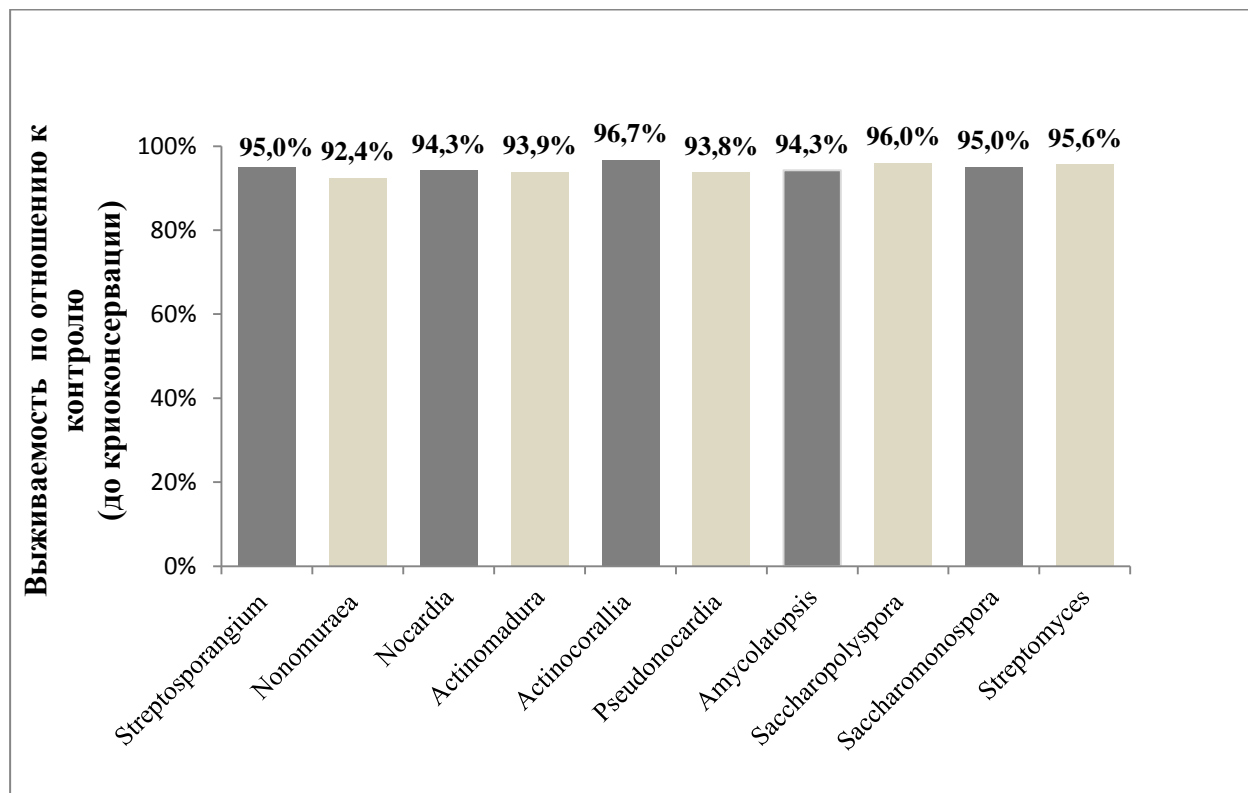


Рис. 23. Средняя выживаемость культур актиномицетов после 3-х лет хранения при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  без использования криопротектора.

Выжившие после криоконсервации колонии каждой культуры были проверены на антибиотическую активность в отношении тест-микроорганизмов методом штриха. Изучение антибиотической активности в течение всего периода хранения показало, что споры актиномицетов обладают не только высокой устойчивостью к замораживанию, но и сохраняют высокий уровень антибиотической активности (90-97%) по отношению к каждому тест-микроорганизму, к которым была установлена антибиотическая активность до замораживания. Следует отметить, что при регулярных пересевах в обычных условиях также наблюдалась небольшая дифференциация колоний на более и менее активные, таким образом, появление менее активных колоний не является следствием замораживания и/или хранения.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на активную разработку новых антибактериальных препаратов и расширение их производства, инфекционные заболевания по-прежнему остаются одной из ведущих причин смерти во всем мире. Бактериальные инфекции ежегодно приводят примерно к 17 миллионам случаев смерти, затрагивая главным образом детей и пожилых людей. Одним из важных факторов возникновения устойчивости микроорганизмов является самолечение и чрезмерное использование антибиотиков, в результате сокращается срок службы антибиотика и возрастает потребность в исследованиях и разработке новых антибиотиков [De Lima Procopio et al. 2012; Davies and Davies, 2010; Okeke, 2003; Spellberg et al. 2008].

Выделение продуцентов из мест их естественного обитания, изучение химического строения вторичных метаболитов и их антибиотической активности в отношении тест-микроорганизмов – основные этапы поиска новых антибиотиков. На протяжении этих этапов очень важно сохранить жизнеспособность культур и их способность к синтезу антибиотиков. Известно, что в процессе хранения может наблюдаться дифференциация колоний, что в свою очередь может привести к сохранению колоний, не обладающих нужными свойствами.

Разработка новых методов выделения продуцентов позволяет увеличить количество культур актиномицетов редких родов, которые не выделяются при стандартных методах выделения. С успехом используются методы выделения актиномицетов с применением циркона, адреналина, гетероауксина. Данные вещества оказывают положительное влияние на выделение таких родов актиномицетов, как *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Nonomuraea* и *Catellatospora* [Кагарлицкий и др., 2003; Филиппова и др., 2010; Куликова, 2017].

Адреналин и гетероауксин являются веществами природного происхождения. Циркон выделяют из растения Эхинацеи пурпурной, основным



действующим веществом является смесь гидроксикоричных кислот, которые обладают антиоксидантным, фунгицидным действием, повышают стрессоустойчивость растений, активизируют ростовые процессы у растений [Малеванная Н.Н. патент, 2005]. Адреналин – биомедиатор, в клетках растений и микроорганизмов регулирует процессы метаболизма и энергетические процессы [Рощина, 2010]. Гетероауксин - биогенный амин, фитогормон, стимулятор роста растений, образуется в листьях из триптофана [Herbert et al., 1964].

В данной работе был разработан метод выделения актиномицетов из почвы с применением сока алоэ. Известно, что сок алоэ широко применяется в медицине при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, для повышения иммунитета, при гнойных ранах и ожогах, при туберкулезе кожи, при блефарите, кератите, конъюнктивите, бронхиальной астме, гинекологических заболеваниях и т.д. [Валевко и др., 2007, Christaki and Florou-Paneri, 2010]. Одним из главных компонентов сока алоэ является алоэ-эмодин (гидроксиантрахинон), данное вещество содержится и в таких растениях как ревень и кассия. Современные исследования показали, что алоэ-эмодин обладает антибактериальным, антигрибковым, противовирусным действием [Stanley et al., 2006; Olennikov, 2009; Nidiri, 2011, Meier et al., 2017]. Противоопухолевое действие алоэ-эмодина заключается в ингибировании пролиферации опухолевых клеток и ингибировании патологического ангиогенеза [Cárdenas, 2006, Chen et al., 2018, Pecere et al., 2000; Kuo et al., 2002]. Кроме алоэ-эмодина сок алоэ древовидного содержит сахара, аминокислоты, стероиды, производные антрацена, эфирные масла, смолистые вещества, янтарную кислоту, лимонную кислоту, яблочную кислоту и др. кислоты, аллантиин, полисахариды, флавоноиды, микроэлементы, сок богат ферментами, витаминами В комплекса, витаминами С и Е, содержит бета-каротин [Муравьева и др., 2002, Olennikov, 2009].

В ходе работы было выделено большое количество культур редких родов актиномицетов: *Micromonospora* – 44 штамма, *Nonomuraea* – 5 штаммов, *Streptosporangium* – 9 штаммов, *Nocardia* – 13 штаммов, *Actinomadura* – 8 штаммов, *Actinocorallia* – 1 штамм, *Pseudonocardia* – 5 штаммов, *Amycolatopsis* – 4

штамма, *Saccharomonospora* – 1 штамм, *Saccharopolyspora* – 1 штамм, *Promicromonospora* – 3 штамма, *Kribbella* – 1 штамм. Было показано, что сок алоэ оказывает ингибирующее действие на бактериальные и грибные колонии, а также стимулирует антибиотикообразование у некоторых культур актиномицетов.

Для выделения актиномицетов были использованы 2 образца почвы из разных регионов: Московской области (дерново-подзолистая почва) и Оренбургской области (чернозем). Полученные результаты показали, что количество выделенных актиномицетов на грамм почвы сильно различается в исследуемых образцах.

В литературе нет данных о численности и биоразнообразии актиномицетов для образцов почв, которые были исследованы нами, но есть данные о том, что разнообразие и количественное содержание актиномицетов зависит не только от вида почв, но и от горизонта отбора проб. Например, в ельнике-черничнике на дерново-грунтово-глееватой почве максимальная численность актиномицетов приурочена к F слою подстилки, при переходе к кустарничковому и моховому ярусам и горизонту A1 почвы количество выделенных актиномицетов резко снижается. Наиболее широкий спектр родов актиномицетов был выявлен в моховом ярусе: роды *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Saccharopolyspora* и *Thermomonospora*, в то время как из почвенного горизонта выделены представители лишь двух родов: *Streptomyces* и *Actinomadura*. В экосистеме широколиственного леса наибольшее разнообразие и численность актиномицетов родов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Nocardiopsis*, *Nocardia*, *Microtetraspora* приурочены ко второму гумусовому горизонту Ah. Для актиномицетов рода *Actinomadura* было установлено, что численность представителей этого рода увеличивается при движении от северных почв к южным, достигая максимума в черноземах и сероземах [Захарова, 2003].

Таким образом, в наших исследованиях различия в количестве выделенных актиномицетов объясняются различием в типе почв из которых они были выделены. Несмотря на разницу между образцами в количестве выделенных

актиномицетов, в обоих вариантах наблюдалось стимулирующее действие алоэ на рост актиномицетов, в том числе увеличивалась доля актиномицетов редких родов.

Угнетение роста бактериальных и грибных колоний на чашках Петри можно объяснить действием алоэ-эмолина. Однако сок алоэ содержит не только алоэ-эмолин, а целый комплекс биологически активных веществ – биогенных стимуляторов, которые образуются в ответ на ряд неблагоприятных внешних воздействий (температура, световое и рентгеновское облучение, воздействие токсических агентов и др.) Химическая природа биогенных стимуляторов недостаточно изучена. Как правило, они представляют собой сложный комплекс веществ. Наибольшей биологической активностью обладают дикарбоновые оксикислоты алифатического ряда, ароматические кислоты большой молекулярной массы, аминокислоты, гуминовые соединения, фосфолипиды, витамины, микроэлементы [Муравьева, 1980]. Для образования биогенных стимуляторов, в наших исследованиях листья алоэ хранились в холодильнике при температуре +4<sup>0</sup>С в темноте. Такие условия, согласно данным литературы, способствуют образованию биогенных стимуляторов [Муравьева, 1980].

Таким образом, стимулирующее действие сока алоэ на различные биохимические процессы, в том числе и на синтез антибиотиков актиномицетами, объясняется наличием в нем биологически активных веществ – биогенных стимуляторов. В наших исследованиях было показано, что внесение сока алоэ в питательную среду в концентрации 10% оказывает положительное влияние на синтез антибиотиков у 6 культур актиномицетов (таблица 18): *Nocardia* sp. OS/21, *Nonomuraea* sp. OS/17, *Actinomadura* sp. OS/37, *Actinomadura* sp. OS/40, *Kribbella* sp. OS/32 и *Streptosporangium* sp. INA 34-06. Культуры актиномицетов были выделены с добавлением сока алоэ в почвенную суспензию, кроме штамма коллекционного *Streptosporangium* sp. INA 34-06. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что сок алоэ может оказывать стимулирующее действие на синтез антибиотиков культурами актиномицетов, в том числе и теми, которые были выделены другими методами.

В тоже время, использование более низких концентраций сока алоэ (5%) не стимулировало антибиотикообразование у исследуемых штаммов. Значит, действие зависит от концентрации веществ-стимуляторов, и для получения положительных результатов стоит выбирать концентрации сока алоэ выше 10%.

На коллекционные штаммы *Str.hygroscopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *Nonomuraea roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281 сок алоэ не оказал воздействия, рост и антибиотикообразование были сопоставимы с контролем.

Результаты воздействия сока алоэ на синтез антибиотиков в ряде экспериментов было аналогичны результатам, полученным при совместном культивировании актиномицетов и тест-микроорганизма *Micrococcus luteus* (таблица 21): более ранний синтез антибиотика отмечен у актиномицетов *Nocardia* sp. OS/21, *Kribbella* sp. OS/32, более продолжительный синтез у *Nonomuraea* sp. OS/17, *Actinomadura* sp. OS/37, *Kribbella* sp. OS/32, возникновение антибиотической активности в отношении *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA) отмечено у *Actinomadura* sp. OS/40.

Наибольшее влияние сока алоэ на синтез антибиотиков было выявлено при культивировании *Nonomuraea* sp. OS/17 в среде с добавлением 10% сока алоэ (таблица 21): наблюдалось увеличение зоны подавления роста тест-микроорганизмов *Staphylococcus aureus* ИНА 00985, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus* (209P/УФ-2), *Micrococcus luteus*. В отношении *Bacillus subtilis* было отмечено не только увеличение зоны подавления, но и более ранний (на 3 сутки) синтез антибиотика.

Увеличение зоны подавления роста тест-микроорганизмов при добавлении сока алоэ наблюдалось при культивировании *Actinomadura* sp. OS/37 в среде с добавлением сока алоэ в концентрации 10% (таблица 21).

Таким образом, нами было показано, что сок алоэ оказывает стимулирующее действие на выделение актиномицетов из почвы и повышает антибиотическую активность у ряда культур актиномицетов. Данный метод можно использовать для выделения актиномицетов из почвы, в том числе для

выделения актиномицетов редких родов, выделить которые сложнее, чем актиномицеты рода *Streptomyces*.

Изучение антибиотической активности культур редких родов актиномицетов показало, что 25 культур активны в отношении гамположительных тест-микроорганизмов, из них 4 культуры (*Saccharopolyspora* sp. OS/56, *Saccharomonospora* sp. OS/57, *Promicromonospora* sp. OS/53, *Nocardia* sp. OS/28) подавляли рост *Saccharomyces cerevisiae*. Антибиотическая активность в отношении *Staphylococcus aureus* (MRSA) выявлена у культур *Micromonospora* sp. OS/2, *Micromonospora* sp. OS/4, *Nonomuraea* OS/17, *Actinomadura* sp. OS/36, *Actinomadura* sp. OS/37, *Actinomadura* sp. OS/41, *Actinomadura* sp. OS/40, *Kribbella* sp. OS/52).

После выделения культур актиномицетов из природных источников важно сохранить их жизнеспособность и антибиотическую активность. Известно, что во время замораживания и хранения мембраны клеток подвергаются действию повреждающих факторов [Грачева и др., 2011, Бланков, Клебанов, 1961; Белоус, Грищенко 1994; Грачева, Осин, 2016; Simone F.P. 1998, Chen et al., 2006; Dumont, 2006]. Основными структурными компонентами мембран являются липиды, которые могут находиться в разных фазовых состояниях в зависимости от условий окружающей среды. Восстановление повреждений, вызванных стрессовыми факторами, зависит от строения липидов и способности липидных слоев к восстановлению структуры мембраны [Бекер, 1987; Грачева, Осин 2016; Simone, 1998; Ryan, 2004]. Кроме того в литературе приводятся данные о влиянии температуры на изменения липидов мембран бактериальных клеток. Показано, что физическое состояние бислоя регулируется количеством насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, и от данного фактора зависит выживаемость бактерий в стрессовых условиях [Yoon et al., 2015].

Таким образом, перед закладкой на длительное хранение культур актиномицетов важно изучить состав и фазовые переходы липидов, входящих в состав клеточных мембран. Полученные данные позволят сделать определенные

выводы о сохранении структурной организации мембран актиномицетов, а так же о способности к регенерации повреждений.

Важным этапом работы стало изучение липидного состава клеточных стенок коллекционных культур актиномицетов: *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, *Nonomuraea roseoviolaceae* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06, а также исследование изменения фазовых состояний липидов при различных условиях. Методом тонкослойной хроматографии было установлено, что состав липидных фракций у коллекционных культур различен (таблица 1), что дало основание полагать о различной устойчивости мембран данных культур актиномицетов. Было показано, что у культуры *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>, липиды находятся в ламеллярной конфигурации, у культур *Streptosporangium* sp. INA 34-06 и *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281 - в инвертированной гексагональной и ламеллярной фазах. Известно, что фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин являются основными компонентами клеточной мембраны бактерий. Однако фосфатидилэтаноламин является неламеллярным липидом, поэтому формирует гексагональные фазы, в отличие от фосфатидилглицерина. Адаптация микроорганизмов зависит от соотношения между ламеллярными и неламеллярными липидами. Известно, что при формировании липидами гексагональных структур увеличивается проницаемость мембран для воды и растворенных в ней веществ [Denich et al., 2003]. Показано, что при воздействии стрессовых факторов изменяется соотношение между фосфатидилглицерином и фосфатидилэтаноламином, при увеличении данного соотношения мембрана становится менее проницаемой для липофильных и полярных молекул. [Murzyn et al., 2005].

Наши исследования дифракционных спектров при нагревании образца частично гидратированной фосфолипидной фракции *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup> до температуры 60°C и последующем охлаждении до 25°C показали, что происходит деструктуризация образца (рис. 5), но измерение спектров после 10 месяцев при хранения образца при +4°C показало полное восстановление

структуры, что говорит о большом потенциале к регенерации поврежденных мембран у *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>.

Таким образом, исследования дали основания полагать, что мембраны *Streptosporangium sp.* INA 34-06 и *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 будут более подвержены воздействию стрессовых факторов, чем мембраны *Str. hygrosopicus* RIA 1433<sup>T</sup>. При изучении выживаемости клеток актиномицетов при -70<sup>0</sup>C в течение длительного периода было показано, что при низких концентрациях клеток утратили жизнеспособность культуры *Streptosporangium sp.* INA 34-06 и *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281, а культура *Str. hygrosopicus* RIA сохранила жизнеспособность на высоком уровне (рис 11).

Полученные данные подтвердили предположения о разной выживаемости клеток актиномицетов. Однако эти результаты были получены для клеток, замороженных в низких концентрациях. При замораживании и хранении культур *Streptosporangium sp.* INA 34-06 и *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 в более высоких концентрациях были получены другие результаты (таблица 2), где показано, что выживаемость исследуемых культур актиномицетов находилась на высоком уровне в течение 3-х лет, и различий в жизнеспособности клеток у трех исследуемых культур выявлено не было. Очевидно, при высоких концентрациях клеток создаются благоприятные условия для сохранения жизнеспособности. Возможно, выделяются в достаточном количестве защитные вещества, предохраняющие от воздействия стрессовых факторов. Выделение актиномицетов рода *Streptomyces* из вечномёрзлых почв Антарктики, а также наличие у некоторых выделенных культур антибиотической активности, подтверждает высокую приспособленность данных культур актиномицетов к выживанию в экстремальных условиях [Encheva-Malinova et al., 2014; Dimitrova et al., 2013; Kamjiam et al., 2019].

Согласно литературным данным спорообразующие микроорганизмы способны переносить замораживание без использования криопротекторов, но в большинстве случаев добавление криопротекторов существенно увеличивает выживаемость микроорганизмов [Hubalek, 2003; Бекер, 1987; Filippova, 2007].

Наши результаты показали, что часто используемый в качестве криопротектора глицерин, не оказывает влияния на выживаемость клеток актиномицетов. Замороженные в низких концентрациях клетки культур *Streptosporangium sp.* INA 34-06 и *N. roseoviolacea subsp. carminata* INA 4281 полностью утратили жизнеспособность даже при использовании криопротектора. В то же время культура *Str. hygrosopicus* RIA сохранила жизнеспособность на высоком уровне как в варианте с добавлением криопротектора, так и без него (рис 11).

Высокая выживаемость при длительном хранении при  $-70^{\circ}\text{C}$  была показана для культур редких родов актиномицетов (рис. 28): *Streptosporangium sp.* OS/7 – OS/15, *Nonomuraea sp.* OS/16 – OS/20, *Nocardia* OS/21- OS/25, OS/28-OS/30 и OS/32, *Actinomadura* OS/34 – OS/41, *Actinocorallia sp.* OS/42, *Pseudonocardia sp.* OS/43 – OS/47, *Amycolatopsis sp.* OS/48-OS/51, *Saccharopolyspora sp.* OS/56, *Saccharomonospora sp.* OS/57, а также для 9 культур стрептомицетов. Сравнительный анализ выживаемости клеток при хранении с криопротектором и без него показал, что внесение криопротектора не влияет на жизнеспособность клеток актиномицетов. Таким образом, данный метод позволяет сохранить жизнеспособность культур актиномицетов и их антибиотическую активность в течение длительного времени без применения криопротектора.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделение актиномицетов из природных источников является первым этапом поиска новых антибиотиков. В почвах обитает большое разнообразие микроорганизмов, между которыми существуют тесные взаимосвязи и борьба за источники питания. При высевах на чашках Петри наблюдается большое количество быстрорастущих колоний бактерий и грибов. Актиномицеты, особенно культуры, относящиеся к редким родам, растут медленнее и их трудно выделить в чистую культуру из-за обилия бактериальных колоний. Важно разрабатывать новые методы, которые позволяют выделить не только быстрорастущие колонии стрептомицетов, но и медленно растущие колонии актиномицетов редких родов. Для этого был разработан новый метод выделения актиномицетов из почвы с применением сока алоэ, с помощью которого удалось выделить большое количество актиномицетов, в том числе актиномицетов редких родов. Выделенные актиномицеты редких родов проявляли антибиотическую активность в отношении тест-организмов и, соответственно, могут быть продуцентами новых биологически активных веществ.

При изучении влияния сока алоэ на актиномицеты было показано его стимулирующее действие на синтез антибиотиков актиномицетами. Возможно, в дальнейшем сок алоэ или его отдельные компоненты можно будет применять для индукции биосинтеза антибиотиков.

Изучение состава и фазово-структурной организации липидов выявило различия в формировании структур клеточных мембран, что позволило объяснить различия в выживаемости актиномицетов разных родов при низких концентрациях клеток. В результате исследований в области долгосрочного хранения при  $-70^{\circ}\text{C}$  разных родов актиномицетов было установлено, что использование криопротектора не влияет на выживаемость клеток и их антибиотическую активность, что позволяет хранить культуры актиномицетов без использования криопротекторов.

## ВЫВОДЫ

1. Изучен состав и фазово-структурная организация фосфолипидов мембран актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06. Установлено, что различия в структурной организации фосфолипидов зависят от их качественного состава. Показано, что ламеллярные структуры более устойчивы к воздействию стрессовых факторов.
2. Изучено влияние низких температур на выживаемость и сохранение антибиотической активности актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281, *Streptosporangium* sp. INA 34-06 при длительном хранении при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Показано, что данные актиномицеты сохраняют высокую жизнеспособность и антибиотическую активность в течение 3-х лет при концентрации клеток  $10^5 - 10^7$ .
3. Показано, что выживаемость актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* RIA 1433T, *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata*, *Streptosporangium* sp. INA 34-06 при длительном хранении в условиях низких температур не зависит от использования криопротектора (10% раствора глицерина), а зависит от концентрации клеток в суспензии.
4. Разработан метод выделения актиномицетов редких родов из почвы с добавлением сока алоэ. В результате было выделено большое разнообразие культур редких родов актиномицетов: *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinocorallia*, *Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Promicromonospora*, *Kribbella*. Установлено, что выделенные культуры обладают антибиотической активностью в отношении тест-микроорганизмов, в том числе в отношении *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA).
5. Изучена выживаемость выделенных культур актиномицетов редких родов в условиях низких температур ( $-70^{\circ}\text{C}$ ). Установлено, что культуры, способные формировать споры, сохраняют высокую жизнеспособность и антибиотическую активность в течение длительного времени без применения криопротектора. Основным показателем успешной закладки на хранение является высокая концентрация ( $10^7-10^8$ ) клеток.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БСА - бычий сывороточный альбумин;

ВМ – воздушный мицелий;

ДАМ – диаминомасляная кислота;

ДАПК – диаминопимелиновая кислота;

ДМСО – диметилсульфоксид;

КВЧ – электромагнитное излучение крайне высокой частоты;

КОЕ – колониеобразующая единица;

СМ – субстратный мицелий;

СВЧ – сверхвысокочастотное излучение;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

УФ – ультрафиолетовое излучение;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс;

ЯМР - ядерный магнитный резонанс;

АТСС – American Type Culture Collection, Американская коллекция типовых культур;

FDA – U.S. Food and Drug Administration, Управление по контролю за продуктами и лекарствами США;

INA – акроним Коллекции культур микроорганизмов ФГБНУ «НИИНА»;

MRSA – methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, метициллинрезистентный золотистый стафилококк;

RIA – Research Institute for Antibiotics, Коллекция культур Института антибиотиков (Россия);

### Сокращения названий микроорганизмов

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B.subtilis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>M.luteus</i>
<i>Nonomuraea roseoviolacea</i> subsp. <i>carminata</i>	<i>N. roseoviolacea</i> subsp. <i>carminata</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Sac. cerevisiae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Streptomyces albogriseolus</i>	<i>Str. albogriseolus</i>
<i>Streptomyces aurantiacus</i>	<i>Str. aurantiacus</i>
<i>Streptomyces canus</i>	<i>Str. canus</i>
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	<i>Str. chrestomyceticus</i>
<i>Streptomyces ederensis</i>	<i>Str. ederensis</i>
<i>Streptomyces glycoverans</i>	<i>Str. glycoverans</i>
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	<i>Str. hygrosopicus</i>
<i>Streptomyces libani</i>	<i>Str. libani</i>
<i>Streptomyces nigrescens</i>	<i>Str. nigrescens</i>

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абызов С. С. Микроорганизмы в леднике центральной Антарктиды // Успехи микробиологии. – 1992. - № 25. – С. 27-49.
2. Абызов С.С., Филиппова С.Н., Кузнецов В.Д. *Nocardiosis antarcticus* – новый вид актиномицета, выделенный из толщи ледника Центральной Антарктики // Изв. АН СССР. Сер. Биол. - 1983. - №4. - С. 559-569.
3. Алферова И.В., Терехова Л.П. Применение метода обогащения почвы карбонатом кальция с целью выделения актиномицетов // Антибиотики и химиотерапия. 1988. - Т. 33. - № 12. - С. 888-889.
4. Антонов В.Ф. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран // Соросовский образовательный журнал. – 1998. - №10. – С. 10-17.
5. Бекер М.Е., Рапопорт А.И., Калакуцкий Л.В., Звягинцев Д.Г., Абызов С.С., Аксенов С.И., Дамберг Б.Э., Лайвениекс М.Г., Шраго М.И., Белоус А.Ал., Пучков Е.О., Дуда В.И., Шевцов В.В., Феофилова Е.П., Зикаланис П.Б., Лозина-Лозинский Л.К., Сидякина Т.М., Бобин Н.Е., Николаев Г.Ал., Вентыня Э.Ю., Кулаев И.С., Жегунов Г.Ф., Говорунов И.Г., Алексеев А.Н., Успенская З.И., Кудряшов Б.Б., Горячев С.Н.. Торможение жизнедеятельности клеток / Под ред. Бекера М.Е. – Рига: Зинатне, 1987. – 240 с.
6. Белоус А.М, Бондаренко Т.П., Бондаренко В.А., Молекулярные механизмы криповреждения мембранных структур // Криобиология и криомедицина. – 1979. - В. 5. С. – 3-13.
7. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология / Под ред. Калугина Е.В. – Киев: Наукова думка, 1994. – 432 с.
8. Бланков Б.И., Клебанов Д.Л. Применение лиофилизации в микробиологии. – М.: Медгиз. - 1961. - 263с.
9. Валевко С.А., Краснюк И.И., Михайлова Г.В. Фармацевтическая технология лекарственных форм // М.:Academia. – 2007. – 592 с.
10. Волков В.Я., Сахаров Б.В., Волкова Л.А. Радиоспектрометрические методы в криобиологии // Криобиология. – 1985. - №4. – С. 3-10.
11. Воробьева Е. А., Гиличинский Д. А. Жизнь в мерзлоте – взгляд на проблему // Проблемы криологии земли. Фундаментальные и прикладные исследования: Тез. докл. межд. конф. Пущино. - 1997. С. 41-42.
12. Высеканцев И.П., Крашенникова Т.К., Олехнович Е.В., Степанюк Л.В. Консервирование бактерий *Pseudomonas putida* при низких температурах // Микробиология. – 1992. – Т.77. - №5. – С. 1098-1099.

13. Галатенко О.А., Терехова Л.П., Ли Ю.В., Малкина Н.Д., Бойкова Ю.В., Зенкова В.А., Катруха Г.С. Образование эхиномицина культурой *Actinomadura* sp. ИНА 654 // Антибиотики и химиотерапия. 2006. Т. 51. С. 3-7.
14. Галатенко О.А., Терехова Л.П., Преображенская Т.П., Применение метода облучения почвенных образцов ультрафиолетом для выделения актиномицетов редких родов // Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. Алма-Ата: Гылым, 1990. С. 29-35.
15. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.Л., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. - М.: Наука. - 1983. – 245 с.
16. Герна Р.А. Хранение микроорганизмов // Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. - М.: Мир, 1983, т.1. - С. 526-533.
17. Грачева И.В., Валова Т.В., Григорьева Г.В. Традиционные и новые защитные среды для низкотемпературной консервации бактерий // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 110. – С. 36-40.
18. Грачева И.В., Осин А.В. Низкотемпературная консервация коллекционных штаммов холерных вибрионов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. - №4. – С. 39-42.
19. Грачева И.В., Осин А.В., Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. - №3. – С. 5-12.
20. Грачева Т.А. Актиномицеты рода *Micromonospora* в наземных экосистемах: Автореф...дис.кан.биол.наук. – М.: 2004 . – с. 25.
21. Давидков Д.С., Данилов В.И., Пейкова С.П. Культивирование дрожжей в магнитном экране // Труды Объед. ин-та ядер исслед. Дубна. 1983. Вып 19. С 8.
22. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. - М.: Высшая школа, 1986. – 448 с.
23. Ефимова Т.П., Печатникова И.Ш., Терешин И.М. Состав мембран *Actinomyces hygrosopicus* в процессе роста и развития // Микробиология. – 1977. – Т.46. - №4. – С. 676-682.
24. Желобецкая О.В., Бабинец О.М., Высеканцев И.П., Рязанцев В.В. Влияние условий криоконсервирования на сохранность пробиотика *Lactobacillus plantarum* // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т.18 - №3. – С.278-281.
25. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. М.: Книжный дом “Университет”. - 2001. - С. 256.
26. Захарова Ольга Семеновна. Актиномицеты рода *Actinomadura* в почвах разных типов : Дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 : Москва, 2003 163 с. РГБ ОД, 61:04-3/288-7.

27. Звягинцев Д.Г. Микроорганизмы в вечной мерзлоте // Успехи микробиологии. – 1992. - № 25. – С. 705-713.
28. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.Л., Зенова Г.М. Биология почв. М.: МГУ. - 2005. - С. 362.
29. Звягинцев Д.Г., Гиличинский Д. А., Благодатский С. А., Воробьева Е.А., Хлебникова Г.М., Архангелов А.А., Кудрявцева Н.Н. Длительность сохранения микроорганизмов в постоянно мерзлых осадочных породах и погребенных почвах // Микробиология. – 1985. – Т.54. – Вып.1. – С. 155-163.
30. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. М.: ГЕОС. 2001. С. 256.
31. Зенова Г.М, Шульга-Михайлова Н.В., Лихачева А.А., Грядунова А.А. Селективные приемы выделения из почвы актиномицетов олигоспоровой группы // Почвоведение. - 2002. - № 4. - С. 465-469.
32. Зенова Г.М. Михайлова Н.В., Звягинцев Д.Г. Динамика популяций олигоспоровых актиномицетов в черноземе // Микробиология. 2000. Т. 69. № 1. С. 127-131.
33. Ипатова О.М. Роль фосфолипидов в процессах повреждения клетки / Фосфолипиды: механизм действия и применения в клинике. Под ред. академика РАМН Арчакова А.И. - М.: Изд. ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН. - 2005. – 318 с.
34. Кагарлицкий Г.О., Кировская Т.А., Олескин А.В. Действие нейромедиаторных аминов на рост и дыхание микроорганизмов [электронный ресурс] / Г.О. Кагарлицкий // М.: Биологический факультет МГУ. – 2003. – Режим доступа: <http://www.sevin.ru/fundecology/biopolitics/biopol2.html>.
35. Каменских Т.Н., Калашникова Е.А., Ившина И.Б. Особенности криоконсервации алканотрофных актинобактерий рода *Rhodococcus* // Вестник Пермского университета. – 2010. - №1. – С. 15-20.
36. Касьянов Г.И., Сязин Г.Е. Криообработка: учебное пособие. [Электронный ресурс] / Краснодар: Экоинвест. – 2014. – Режим доступа: <http://publishprint.ru//d/237238/d/krioobrabotka.-kasyanov-syazin-pr.pdf>
37. Киселев М.А. Методы исследования липидных наноструктур на нейтронных и синхротронных источниках // Физика элементарных частиц и атомного ядра. – 2011. – Т. 42. - №2. – С. 579 – 635.
38. Киселев М.А., Ермакова Е.В., Рябова Н.Ю., Найда О.В., Забелин А.В., Погорелый Д.К., Корнеев В.Н., Балагуров А.М. // Структурные исследования липидных мембран на синхротронном источнике Сибирь-2. Кристаллография. – 2010. – Т.55. - № 3., С. 503-509.

39. Комолова А.О., Спирина Е.В., Соколова Е.М., Ривкина Е.М. Микроорганизмы вечной мерзлоты и их биологический потенциал // I-ый Российский микробиологический конгресс. Материалы конгресса. – 2017. С.53-54.
40. Красильников А.П. Справочник по антисептике. Минск: Высшая школа, 1995. С. 368.
41. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. Л: Наука, 1981. – 339с.
42. Кудряшова Е.Б., Арискина Е.В., Карлышев А.В. Микробное разнообразие образцов позднеплиоценовых – раннеплейстоценовых многолетнемерзлых грунтов Сибири // I-ый Российский микробиологический конгресс. Материалы конгресса. – 2017. С.55-56.
43. Куликова Н.Г. Разработка селективных методов выделения актинобактерий - потенциальных продуцентов антибиотиков из разных экологических систем: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (14.03.07) / Куликова, Нина Георгиевна; ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» . – Москва. – 2017. – 145.
44. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. Москва: Мир. - 1986. – с. 488.
45. Ли Ю.В. Выделение актиномицетов из почвы с использованием КВЧ – излучения: дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (03.00.07) / Ли Юлия Валентиновна; НИИ по изыск. новых антибиот. им. Г.Ф. Гаузе РАМН. – Москва, 2003. – 152 с.
46. Малахаева А.Н., Ляшова О.Ю., Плотников О.П., Осин А.В. Хранение штаммов *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Brucella abortus* 19ВА в жизнеспособном состоянии путем их глубокого замораживания // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. - №1. – С. 63-66.
47. Манучарова Н.А. Молекулярно-биологические аспекты исследований в экологии и микробиологии: Учебное пособие // М.: Издательство МГУ. – 2010. – 47 с.
48. Мачавариани Н.Г., Терехова Л.П. Новый метод выделения актиномицетов из почвы // Сборник научных докладов. Актуальные вопросы в современной науке. 2013. Варшава. С. 9-12.
49. Микулинский Ю.Е., Высеканцев И.П., Кадникова Н.Г., Ананьина А.Е., Марценюк В.Ф., Кудокоцева О.В., Петренко Т.Ф., Дубрава Т.Г., Котляров А.О., Стегний М.Ю., Тупчиенко Г.С., Гордиенко А.Д., Федец О.И. Холодовой стресс и биологические системы / Под. ред. Цуцаевой А.А. – Киев: Наук.думка, 1991. – 176 с.



50. Михайлова Н.В. Выявление олигоспоровых актиномицетов с применением предобработки хлорамином Б // Проблемы экол. и физиол. микроорганизмов: К 110-летию со дня рожд. проф. Е.Е. Успенского. Научн. конф., 21 дек., 1999. Москва, МГУ. М. 2000. С.79.
51. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия: Учебник // М.: Медицина. – 2002. – 659 с.
52. Муравьева И.А. Технология лекарств // М.: Медицина. – 1980. – Т.1. – 391 с. – Т.2. – 311 с.
53. Нардид О.А. Использование особенностей спектров ЭПР ионов переходных металлов при исследовании концентрирования солей в зависимости от условий замораживания // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. – 24. - №3. – С. 212-221.
54. Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. – М: Колос, 1971. – 343с.
55. Одум Ю. Экология. 1986. М.: Мир. Т.1. Т.2. С.326, 327.
56. Определитель бактерий Берджи. В 2-х томах. Т.2: Пер. с англ. / под ред. Дж. Хоулта Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.:Мир, 1997. – 368 с.
57. Павлович С.А. Способ выращивания актиномицетов А.с. СССР. 200122 // Б.и. 1979. 36. С. 43.
58. Пат. 2123044 РФ, МПК С12 N1/04, С12 N11/00. Способ длительного хранения естественных симбиотических ассоциаций микроорганизмов человека и животных / Шендеров Б. А., Гахова Э. Н., Манвелова М. А., Пиорунский Д. А., Карнаухов В. Н. // Оpubл. 10.12.1998.
59. Пат. № 2257059 РФ. Рострегулирующий комплекс, способ его получения, препарат на его основе и применение в сельскохозяйственной практике / Малеванная Н.Н. // Оpubл. 27.07.2005.
60. Першина Е.В., Андронов Е.Е. Почвенный микробиом – уникальный природный ресурс России // Материалы конгресса. I-й Российский микробиологический конгресс. 2017. Пущино. С. 70. С.
61. Петриков К.В., Власова Е.П., Понаморева О.Н., Алферов В.А., Якшина Т.В., Нечаева И.А., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Самойленко В.А., Филонов А.Е. Сохранение жизнеспособности и деградативной активности микроорганизмов-нефтедеструкторов при различных способах хранения биомассы // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2008. - №2. – С. 226-237.
62. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М.: Издательство РАМН. - 2000. - 52 с.

63. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. - 2009. - №4(12). – С. 99-121.
64. Рощина В.В. Нейротрансмиттеры – биомедиаторы и регуляторы растений: Учебное пособие. [Электронный ресурс] / В.В. Рощина // Пушино: Институт биофизики клетки РАН. – 2010. – Режим доступа: <http://window.edu.ru/resource/504/68504/files/neurotransmitters.pdf>.
65. Рябова Н.Ю., Киселев М.А., Бескровный А.И., Балагуров А.М. Исследование структуры многослойных липидных мембран методом дифракции нейтронов в реальном времени. // Физика твердого тела. – 2010. – Т.52. – В.5. – С. 984-99.
66. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям. Фитотерапия. // М.: Недра. – 1987. – 512 с.
67. Терехова Л.П., Галатенко О.А., Алферова И.В., Преображенская Т.П. Использование селективных сред для выделения актиномицетов // Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. Алма-Ата: Гылым, 1990. С. 5-13.
68. Терехова Л.П., Галатенко О.А., Преображенская Т.П. Антибактериальные антибиотики из культур редких родов актиномицетов // Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. Алма-Ата: Гылым, 1990. С. 70-75.
69. Терехова Л.П., Галатенко О.А., Преображенская Т.П. Образование антибиотиков культурами рода *Actinomadura* // Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. Алма-Ата: Гылым, 1990. С. 76-82.
70. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Гальченко В.Ф. Многолетнее хранение коллекционных культур актинобактерий // Микробиология. – 2012. – Т. 81. - №5. – С. 682-690.
71. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Касаикина О.Т., Круговов Д.А., Гальченко В.Ф. Индукция роста и стабилизация популяционного состава *Saccharopolyspora erythraea* соединениями из группы катехоламинов // Микробиология. – 2010. – Т. 79. - №2. – С. 213-218.
72. Цуцаева А.А., Ананьина А.Е., Балыбердина Л.М., Степанюк Л.В., Павленко Н.В. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов // Микробиология. – 2008. – Т.77. - №5. – С. 696-700.
73. Agrawal P., Goodfellow M. Selective isolation and characterization of members of the family Streptosporangiaceae // Actinomycetes. - 1990. - Vol. 1. - № 2. - P. 48.

74. Al-Diwany L.J., Unsworth B.A., Cross T.J. A comparison of membrane filters for counting *Thermoactinomyces endosporus* in spore suspension and river water // J. Appl. Bacteriol. - 1978. - Vol. 45. - P. 249-258.
75. An S., Couteau C., Luo F., Neveu J., DuBow M.S. Bacterial diversity of surface sand samples from the Gobi and Taklamaken deserts // Microb. Ecol. – 2013. - № 66. – P. 850–860.
76. Anghelescu L., Dobrota S., Popescu A. Comparative considerations on methods and media used for the isolation of actinomycetes from the soil // Symp. Soil Biol., 6-th: Abstr. – Bucuresti. 1977. P. 59-66.
77. Balts R.H. Antimicrobials from actinomycetes: back to the future // Microbe. – 2007. – Vol. 2. - № 3 - P. 125-131.
78. Berdy J. Bioactive Microbial Metabolites // J. Antibiot. - 2005. - Vol. 58. - № 1. - P. 1-26.
79. Bredholt H., Fjaervic E., Johnsen G., Zotchev S.V. Actinomycetes from sediments in the Trondheim Fiord, Norway: diversity and biological activity // Mar drugs. – 2008. – Vol. 6. - №1. – P. 12-24.
80. Breierova E., Kockova-Kratochvilova A. Cryoprotective effects of east extracellular polysaccharides and glycoproteins // Cryobiology. – 1992. - № 29. – P. 385-390.
81. Bull A.T. Stach J.E.M., Ward A.S., Goodfellow M. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions // Antonie van Leeuwenhoek. – 2005. – Vol. 87. - № 3. – P. 65-79.
82. Butler M.S., Buss A.D. Natural products – the future scaffolds for novel antibiotics? // Biochemical Pharmacology. – 2006. - №71. – P. 919-929.
83. Cardenas C., Quesada A.R., Medina M.A. Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin // Cell. Mol. Life Sci. – 2006. – Vol. 63. – P. 3083-3089.
84. Chattopadhyay M.K. Bacterial cryoprotectants // Resonance. – 2002.- V 7. - №11 – P. 59-63.
85. Chen H.C., Lin C.W., Chen M.J. The effects of freeze-drying and rehydration on survival of microorganisms in Kefir // Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. – 2006. – V. 19. - № 1. – P. 126-130.
86. Chen Q., Li K-T., Tian S., Yu T-H., Yu L-H., Lin H-D., Bai D-Q. Photodynamic therapy mediated by aloe-emodin inhibited angiogenesis and cell metastasis through activating MAPK signaling pathway on HUVECs // Technology in cancer research & treatment. – 2019. – V. 17. – P. 1-11.
87. Christaki E.V. and Florou-Paneri P.C. *Aloe vera*: A plant for many uses // Journal of Food, Agriculture & Environment. – 2010. - V. 8. - № 2. – P. 245-249.
88. Cody W.L.,<sup>1</sup> Wilson J.W., Hendrixson D.R., McIver K.S., Hagman K.E., Ott C.M., Nickerson C.A., Schurr M. J. Skim milk enhances the preservation of

- thawed -80°C bacterial stocks // Journal of microbiological methods. – 2008. – V. 75. - №1. – P. 135-138.
89. Costa E., Usall J., Teixido N., Garsia N., Vinas I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying // Journal of applied microbiology. – 2000. – V. 89. - № 5. – P. 793-800.
  90. Crabielle-Madelmont C., Perron R. Calorimetric studies on phospholipids-water systems: I. DL-Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)-water system // J. of Colloid and Interface Science. – 1983. - V. 95 - P. 471-482.
  91. Crowe J.H., Crewe L.M., Hoekstra F.A. Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. – 1989. – V.21. - № 1. – P. 77-91.
  92. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2010; 74: 417–433.
  93. De Lima Procopio R.E., da Silva I.R., Martins M.K., de Azevedo J.L., de Araujo J.M. Antibiotics produced by Streptomyces. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2012; 16: 5: 466–471.
  94. Denich T.J, Beaudette L.A, Lee H, Trevors J.T. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes // J Microbiol Methods. – 2003. – V. 52. - № 2. – P. 149-182.
  95. Dimitrova D., Dorkov P., Gocheva B. Antibiotic complex, produced by an antarctic actinomycete strain *S.anulatus* 39 LBG09 // Bulgarian Journal of Agricultural Science.- 2013. – V. 19. - № 2. – P. 72-76.
  96. Dumont F., Marechal P., Gervais P. Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze-thaw cycles with freezing to -196<sup>0</sup>C // Applied and environmental microbiology. – 2006. – V. 72. - № 2. – C. 1330-1335.
  97. Encheva-Malinova M., Stoyanova M., Avramova H., Pavlova Y., Gocheva B., Ivanova I., Moncheva P. Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils // Biotechnology and Biotechnological Equipment. – 2014. – V. 28. - № 4. – P. 721-727.
  98. Ethier J.F. Cloning of two xynalase genes from the new isolated actinomycetes *Actinomadura* sp. strain FC 1 and characterization of the gene product // Canadian J. of Microbiology. 1994. Vol. 40. № 5. P. 362-368.
  99. Ewert M., Deming J.W. Selective retention in saline ice of extracellular polysaccharides produced by the cold-adapted marine bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H // Annals of Glaciology. – 2011. - № 52. P. 111-117.
  100. Fang B-Z, Salam N., Han M-X, Jiao J-Y, Cheng J., Wei D-Q, Xiao M., Li W-J. Insights on the Effects of Heat Pretreatment, pH, and Calcium Salts on

- Isolation of Rare Actinobacteria from Karstic Caves // *Front Microbiol.* – 2017 – Vol. – 8. – P.1-9.
101. Filippova S.N., Surgucheva N.A., Kuznetsov V.D., El'-Registan G.I., Gal'chenko V.F. Optimization of protective media for actinomycetes storage in liquid nitrogen // *Microbiology.* – 2007. – V.76.- №4Ю – P. 506-509.
  102. Gallagher J., Winters A., Barron N., Mchale L., Mchale A.P. Production of cellulase and  $\beta$ -glucosidase activity during growth of actinomycete *Micromonospora chalcea* on cellulose-containing media // *Biotechnology Letters.* 1996. Vol. 18. № 5. P. 537-540.
  103. Gavrish E., Bollmann A., Epstein S., Lewis K. A trap for in situ cultivation of filamentous actinobacteria // *J. Microbiol. Methods.* 2008. № 72. Vol 3. P. 257-262.
  104. Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics // *Natural product reports.* – 2017. – Vol. 34. - № 10. – P. 1203-1232.
  105. Gilichinsky D.A. and Vagener S. Historical review. In: *Viable microorganisms in permafrost* (D. A. Gilichinsky ed). Russian Academy of Sciences. Pushchino – 1994. - P. 7-20.
  106. Gilmour M.N., Turner G., Berman R.G., Krenzer A.K. Compact liquid nitrogen storage system yielding high recoveries of gram-negative anaerobes // *Applied and environmental microbiology.* – 1978. - №35. – P. 84-88.
  107. Golinska P., Wang D., Goodfellow M. *Nocardia aciditolerans* sp. nov., isolated from a spruce forest soil // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2013. – Vol. 103. - № 5. – P. 1079-1088.
  108. Goodfellow M. The actinomycetes 1. Supra genetic classification of actinomycetes // In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology.* The Williams and Wilkins Co: Baltimore. – 1989. – Vol. – 4. – P. 2333-2339.
  109. Goodfellow, M. and Cross. T. Classification // In *The Biology of the Actinomycetes.* / M. Goodfellow, M. Mordarski and S.T. Williams, Eds. Academic Press: London. – 1984. - P. 7-164.
  110. Gorman R., Adley C.C. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-85^{\circ}\text{C}$  for long-term preservation of *Campilobacter jejuni* // *Lett. Appl. Microbiol.* -2004. - № 38. – P. 306-310.
  111. Green P.N., Woodford S.K. Preservation studies on some obligately methanotrophic bacteria // *Letters in applied microbiology.* – 1992. - № 14. – P. 158-162.
  112. Hallet F. R., Watton J., Krygsman P. Vesicle Sizing. Number distributions by dynamic light scattering // *Biophys. J.* - 1991. - V. 59 - P. 357-362.
  113. Hamaki T., Suzuki M. Fudou R., Jojima Y., Kajiura T., Tabuchi A., Sen K., Shibai H. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extra agar

- medium // Journal of bioscience and bioengineering. – 2005. – Vol. 99. - № 5. – P. 485-492.
114. Hanka L.J., Schaadt R.D. Method for isolation of *Streptoverticillium* from soil // J. Antibiot. - 1988. - Vol. 44. - № 4. - P. 576-578.
  115. Haque U., Rahman A., Haque A, Sarker A.K., Islam A.U.I. Modulation of antibacterial activity of actinomycetes by co-culture with pathogenic bacteria // Bangladesh Pharmaceutical Journal. – 2015. – V. 18. – P. 61-65.
  116. Hayakawa M. Selective isolation of rare actinomycete genera using pretreatment techniques // Selective isolation of Rare Actinomycetes / Eds. Kurtböke I. Australia: Queensland Complete Printing Services, 2003. - P. 56-82.
  117. Hayakawa M., Iino H., Takeucui S., Yamazaki T. Application of method incorporating treatment with chloramine-T for the selective isolation of *Streptosporangiaceae* from soil // J. Ferment. Bioeng. - 1997. - Vol. 84.- P. 559-602.
  118. Hayakawa M., Momose Y., Kajiura T., Yamazaki T., Tamura T., Hatano K., Nonomura H. A selective isolation method for *Actinomadura viridis* in soil // J. Ferment. Bioeng. - 1995. - Vol. 79. - P. 287-289.
  119. Hayakawa M., Momose Y., Yamazaki T. A method for the selective isolation of *Microtetraspora glauca* and related four-spored actinomycetes from soil // J. of Appl. Bacteriol. - 1996. - Vol. 80. - № 4. - P. 375-386.
  120. Hayakawa M., Otaguro M., Takeuchi T., Yamazaki T., Iimura Y. Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter // Anton Leeuwenhoek Int. J. Gen. M. - 2000. - Vol. 78. - № 2. - P. 171-185.
  121. Hayakawa M., Tamura T., Nonomura H. Selective isolation of *Actinoplanes* and *Dactylosporangium* from soil by using  $\gamma$  - collidine as the chemoattractant // J. Ferment. Bioeng. - 1991. - Vol. 72. - № 6. - P. 426-432.
  122. Herbert E.J., Donald G.C. «Indolil-3-acetic acid» // Org. Synth. 44:64.; Coll. – 1964. - №5. – p. 654.
  123. Hirsch C.F., Christensen D.L. A novel method for selective isolation of actinomycetes // Annual. Meeting ASM: Abstr. - 1982. - P. 112-113.
  124. Hirsh P., Mevs U., Kroppenstedt R.M. Schumann P., Stackebrandt E. Cryptoendolithic actinomycetes from antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932 // Syst. Appl. Microbiol. - 2004. - Vol. 27. - P. 166-174.
  125. Hoishen Ch., Gura K., Luge C., Gumpert J. Lipid and fatty acid composition of cytoplasmic membranes from *Streptomyces hygroscopicus* and its

- stable protoplast – type L form // *J. Bacteriol.* – 1997. - V. 179. - №11. - P. 3430-3436.
126. Holte L.L., Gawrish K. determining ethanol distribution in phospholipid multilayers with MAS-NOESY spectra // *Biochemistry.* – 1997. – V. 36. – P. 4669-4674.
127. Hop D.V., Sakiyama Y., Binh C.T.T., Otugo M., Hang D.T., Miyadoh S., Luong D.T., Ando K. Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity // *The journal of Antibiotics.* – 2011. - № 64. – P. 599-606.
128. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // *Criobiology.* – 2003. - №46. P. 205-229.
129. Jiang Y., Li Q., Chen X., Jiang C. Isolation and cultivation methods of Actinobacteria / *Actinobacteria – Basics and Biotechnological Applications.* ed. D. Dhanasekaran. - Rijeka: InTech: 2016. – p. 39–57.
130. Kamjam M., Nopnakorn P., Zhang L., Peng F. *Streptomyces polaris* sp. nov. and *Streptomyces septentrionalis* sp. nov., isolated from frozen soil // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2019. – V. 112.- P. 375-387.
131. Khanna M., Solanki R., Lal R. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds // *International journal of advanced biotechnology and research.* – 2011. – Vol 2. - P. 357-375.
132. Kim S.J., Yim J.H., Cryoprotective properties of exopolysaccharide (P-21653) produced by antarctic bacterium *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653 // *Journal of Microbiology.* – 2007. – V. 45. - № 6. – P. 510-514.
133. Kirchhoff W. H., Levin I. W. Description of the thermotropic behaviour of the membrane bilayers in the terms of raman spectral parameters: a two-state model // *J. Res. of the Nat. Bureau of Standards.* - 1987. - V. 92. P. 113-127.
134. Koenig G.L. Viability of and plasmid retention in frozen recombinant *Esherichia coli* over time: a ten year prospective study // *Applied and environmental microbiology.* – 2003. - № 11. – P. 6605-6609.
135. Kroppenstedt R.M., Goodfellow M. The family *Thermomonosporaceae: Actinocorallia, Actinomadura, Spirillospora and Thermomonospora* / *The procaryotes. Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes.* Eds: Dworkin M., Falcow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. New-York Springer. – 2006. – Vol. 3. – P. 682-724.
136. Kuo P. L., Lin T. C., Lin C. C. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci.* – 2002. - № 71. – P. 1879–1892.

137. Kurtböke D.I., Chen C.F., Williams S.T. Use of polyvalent phage for reduction of streptomycetes on soil dilution plates // *J. of Appl. Bacteriol.* 1992. Vol. 72. № 2. P. 103-111.
138. Kurtmann L., Carlsen C.U., Skibsted L.H., Risbo J. Water activity-temperature state diagrams of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5): influence of physical state on bacterial survival during storage // *Biotechnology Progress.* - 2009. - V.25. - № 1. – P. 265-270.
139. Lechevalier H.A., Lechivalier M.P., Gerber N.N. Chemical composition as a criterion in the classification of actinomycetes // *Adv. Appl. Microbiol.* - 1971. - № 14. – P. 47-72.
140. Leslie S.B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H., Crowe L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying // *Applied and environmental microbiology.* – 1995. – V. 61 - № 10. – C. 3592-3597.
141. Lienhard P., Terrat S., Prevost-Boure N.C., Nowak V., Regnier T., Sayphoummie S., Panyasiri K., Tivet F., Mathieu O., Leveque J., Maron P-A., Ranjard L. Pyrosequencing evidences the impact of cropping on soil bacterial and fungal diversity in Laos tropical grassland // *Agron. Sustain. Dev.* – 2014. - № 34. – P. 525–533.
142. Long P.F., Wildman H.G., Amphlett G.E. The use of statistical models to predict the effects of pretreatments on the total viable counts of actinomycetes isolated from soil // *Actinomycetes.* – 1994. – №5. – P. 1-8.
143. Lumyong S., Nakaew N., Pathom-agree W., Lumyong P. Phylogenetic analysis of rare actinomycetes from cave soils in northern Thailand and their antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae* and MRSA // *Int. Symp. Biology of Actinomycetes.*, 14-th: Abstr. 2007. P. 126.
144. Marx J.G., Carpenter S.D., Deming J.W. Production of crioprotectant extracellular polycaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions // *Canadian Journal of Microbiology.* – 2009. – V. 55. - № 1. – P. 63-72.
145. McKenna F., El-Tarabily K.A., Petrie S., Chen C., Dell B. Application of actinomycetes to soil to ameliorate water repellence // *Lett. Appl. Microbiol.* 2002. Vol. 35. № 5. P. 107-112.
146. Meier N., Meier B., Peter S., Wolfram E. In-Silico UHPLC method optimization for aglycones in the herbal laxatives *Aloe barbadensis* Mill., *Cassia angustifolia* Vahl Pods, *Rhamnus frangula* L.Bark, *Rhamnus purshianus* DC. Bark, and *Rheum palmatum* L. Roots // *Molecules.* – 2017. – V. 22. – P. 1-12.
147. Miquely E., Martin C., Manuel C.H., Manzanal B. Synchronous germination of *Streptomyces antibioticus* spores: Tool for analysis of hyphal



- growth in liquid cultures // FEMS Microbiol. Lett. 1993. Vol. 109. № 2-3. P. 123-130.
148. Morein S., Andersson A-S., Rilforst L., Lindblom G. Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a "window" between gel and non-lamellar structures // J.Biol.Chem. – 1996. – V. 271. - № 12. – P. 6801-6809.
  149. Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. Preservation of microorganisms by drying: a review // Journal of microbiological methods. – 2006. – V. 66 – №2. – P. 183-193.
  150. Murzun K., Rog T., Pasenkiewicz-Gierula M. Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane // Biophysical Journal. – 2005.- V. 88. - №2. – P. 1091-1103.
  151. Natsume M., Yasui K., Marumo S. Calcium ion as a regulator of aerial mycelium formation in actinomycetes // Abstracts 7 th International Symposium on Biology of Actinomycetes. Tokyo. - 1988. - P. 107.
  152. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years // Journal of natural products. – 2007. – Vol. 70. - № 3. – P. 461-477/
  153. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981-2014 // Journal of natural products. – 2016. – Vol. 79. - № 3. – P. 629-661.
  154. Nichols D.S., Olley J., Garda H., Brenner R.R., McMeekin T.A. Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of *Shewanella gelidimarina* // Appl. and Environment. Microbiol. - 2000. - V.66. № 6. - P.2422-2429.
  155. Nidiry E. S. J., Ganeshan G., Lokesha A.N. Antifungal activity of some extractives and constituents of *Aloe vera* // Research Journal of Medicinal Plants. – 2011. – V. 5. - №2. – P. 196-200.
  156. O'Donnell A.G., Minnikin D.E., Goodfellow M. Integrated lipid and wall analysis of actinomycetes // Chemical methods in bacteria systematics / Eds. M.Goodfellow and D.E. Minnikin. London.: Academic Press. – 1985. P 131-143.
  157. Oh D.-C., Jensen P.R., Kauffman C. A., Fenical W. Libertellenones A-D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition // Bioorg. Med. Chem. – 2005. – №13. – P. 5267–5273.
  158. Okeke I.N. Antibiotic use and resistance in developing countries, in: S. Knobler, S. Lemon, M. Najafi, T. Burroughs (Eds.), The Resistance Phenomenon in Microbes and Infectious Disease Vectors: Implications for Human Health and Strategies for Containment–workshop Summary, Institute of Medicine, National Academy of Science, Washington DC. 2003; 132–139.

159. Okoro C.K., Brown R., Jones A.L., Andrews B.A., Asenjo J.A., Goodfellow M., Bull A.T. Diversity culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2005. – Vol. 95. - № 2. – P. 121-133.
160. Olennikov D.N., Ibragimov T.A., Chelombit'ko V. A., Nazarova A. V., Rokhin A. V., Zilfikarov I. N. Chemical composition of *Aloe arborescens* and its change by biostimulation // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2009. - V. 45. - №4. – P.478-482.
161. Ootoguro M., Hayakawa M., Yamazaki T., Iimura Y. An integrated method for the enrichment and selective isolation of *Actinocineospora* spp. In soil and plant litter // *J. Appl. Microbiol.* - 2001. - Vol. 91. - № 1. - P. 118-130.
162. Ootoguro M., Yamamura H., Quintana E.T. The Family *Streptosporangiaceae* / *The prokaryotes: Actinobacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2014. – P. 1011-1045.
163. Pecere T., Gazzola M. V., Mucignat C., Parolin C., Vecchia F. D., Cavaggioni A., Basso G., Diaspro A., Salvato B., Carli M., Palu, G. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors // *Cancer Res.* – 2000. - №60Ю – P. 2800–2804.
164. Pehkonen K.S., Roos Y.H., Miao S., Ross R.P., Stanton C. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG(LGG) // *Journal of applied microbiology*. – 2008. – V. 104. - № 6. – P. – 1732-1743.
165. Perry S.F. Freeze-drying and Criopreservation of bacteria. Protocol // *Molecular biotechnology*. – 1998. – V. 9.- P. 59-64.
166. Polsinelli M, Mazze P.G. Use of membrane filters for the selective isolation of actinomycetes from soil // *FEMS Microbiol. Lett.* 1984. Vol. 22. P. 79-83.
167. Pratiwi R.H., Hidayat I., Hanafi M., Mangunwardoyo W. Identification and screening of rare actinomycetes from Neesia altissima BI // *AIP Conference Proceedings*. – V. 1862.
168. Qiu, D., Ruan, J. & Huang, Y. (2008). Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. Vol. 74. №17. P. 5593-5597.
169. Qui D., Ruan J., Huang Y. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora* // *Applied and environmental microbiology*. - 2008.- V. 7. -№17. – P. 5593-5597.
170. Ryan J. General guide for cryogenically storing animal cell cultures. Technical Bulletin / Corning, Inc. – 2004. - c. 10.

171. Ryan M.J., Smith D. Cryopreservation and freeze-drying of fungi employing centrifugal and shelf freeze-drying // *Methods in molecular biology*. - 2007. - № 368. P. 127-140.
172. Santivarangkna C., Wenning V., Foerst P., Kulozik U. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying // *Journal of Applied microbiology*. – 2007. – V. 102. – P. 748-756.
173. Schumann P., Kampfer P., Busse H.-J and Evtushenko L.I. For the Subcommittee on taxonomy of the suborder *Micrococccineae* of the International committee on systematics of *Prokaryotes*. Proposed minimal standards for describing new genera and species of suborder *Micrococccineae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* -2009. Vol. – 59. – P. 1823-1849.
174. Shashkov S. N., Kiselev M. A., Tioutiounnikov S. N., Kiselev A. M., Lesieur, P. The study of DMSO/water and DPPC/DMSO/water system by means of the X-Ray, neutron small-angle scattering, calorimetry and IR spectroscopy // *Physica B*. - 1999. - V. 271. - P. 184-191.
175. Shirling E B, and Gottlieb D. Methods of characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1966, 16: 313-340.
176. Simione F.P. Cryopreservation manual / American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Nalge Nunc International Corp. - 1998. – 8 c.
177. Spellberg B., Guidos R., Gilbert D., Bradley J., Boucher H.W., Scheld W.M. et al. The epidemic of antibiotic – resistance infection: a call to action for the medical community from the infection diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 46: 155-164.
178. Standfast N.F., Jorgensen W.K. Comparison of the infectivity of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale* for cattle after cryopreservation in either dimethylsulphoxide or polyvinylpyrrolidone // *Australian veterinary journal*. – 1997. - № 75. – P. 62-63.
179. Stanley M.C., Ifeanyi O.E, Eziokwu O.G. Antimicrobial effects of *Aloe vera* on some human pathogens // *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* – 2014. – V.3 - №3Ю –P. 1022-1028.
180. Stomeo F., Makhalanyane T.P., Valverde A., Pointing S. B., Stevens M.I., Craig S. Cary C.S., Tuffin M.I., Cowan D.A. Abiotic factors influence microbial diversity in permanently cold soil horizons of a maritime-associated Antarctic Dry Valley // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2012. – P. 1-15.
181. Stutzenberger F. Extracellular enzyme production by *Thermomonospora curvata* grown on bagasses // *J. of Industrial. Microbiol.* 1994. Vol. 13. № 1. P. 35-42.

182. Suzuki S.I., Okuda T., Komatsubara S. Selective isolation and distribution of *Actinobispora* strains in soil // Can. J. Microbiol. 2000. Vol. 46. № 8. P. 708-715.
183. Suzuki S.I., Okuda T., Komatsubara S. Selective isolation and distribution or the genus *Planomonospora* in soil // Can. J. Microbiol. 2001. Vol. 47. № 3. P. 253-263.
184. Takahashi K., Totsuka A., Nakakuki T., Nakamura N. Production and application of a maltogenic amylase by a strain of *Thermomonospora viridis* TF-35 // Starch Staerke. 1992. Vol. 44. P. 96-101.
185. Terekhova L. Isolation of actinomyces with the use of microwaves and electric pulses // Selective isolation of rare actinomycetes. Ed. Ipek Kurtböke. Queensland. Australia. University of the Sunshine Coast. 2003. P.82-101.
186. Tivari K., Gupta R.K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics // Critical reviews in biotechnology. – 2012. – Vol. 32. - № 2. P. 108-132.
187. Tran T.- H., Chang W.-J., Kim Y.-B. , Yoon J.-Y., Koo Y.-M., Kim E.-K., Kim J.-H. Long-term preservation of high initial bioluminescence of lyophilized *Photobacterium phosphoreum*: Effect of skim milk and saccharose at various temperatures // Korean Journal of Chemical Engineering. – 2007. – V.24. - №6. – P. 1053-1057.
188. Tsao P.H., Leben C., Keit G.W. An enrichment method for isolation actinomycetes that produce diffusible antifungal antibiotics // Phytopathology. - 1960. - Vol. 50. - P. 81-91.
189. Tymczyszyn E.E., Diaz M.R., Gomez-Zavaglia A., Disalvo E.A. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose // Journal of Applied microbiology. – 2007. – V. 103. – P. 2410-2419.
190. Tymczyszyn E.E., Sosa N., Gerbino E., Hugo A., Gomez-Zavaglia A., Schebor C. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix // Int J Food Microbiol. – 2012. – V. – 155. – P. 217-21.
191. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G. F. , Chater K.F., Douwe van Sinderen Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum // Microbiology and Molecular biology Reviews. - 2007. - V. 71. - №3. - P. 495–548.
192. Votava M., Stritecka M. Preservation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* at -70 degrees C. // Criobiology. – 2001. - № 43. – P. 85-87.

193. Wang Y., Zhang Z.S., Ruan J.S., Wang Y.M., All S.M. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* - 1999. - Vol. 23. - P. 178-187.
194. Williams W.P. Cold-induced lipid phase transitions // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B.Biological Sciences.* London.-1990.-V.326.-№1237.-P.515-697.
195. Xu L., Li Q., Jiang C. Diversity of soil actinomyces in Yunnan, China // *Appl. Environment. Microbiology.* – 1996. – V. - 62. – P. 144-248.
196. Yamaguchi T. Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes // *J. Bacteriol.* 1965. V. 89. P. 444-453
197. Yoon Y., Lee H., Lee S., Kima S., Choi K-H. Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses // *Food Research International.* – 2015. – V. 72. – P. 25-36.