

ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ПУТЕМ ПРОВЕДЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО УФ-МУТАГЕНЕЗА

А.Х. Хасенова¹, М.А. Акылова², З.Ж. Турлыбаева¹, Р.Ш. Галимбаева¹, А.Ж. Султанова¹

¹ ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, г. Алматы, Казахстан

² АО «Центральная клиническая больница» Казахстан, Алматы

Одновременно с расширением области применения антибиотиков увеличилось число патогенных штаммов микроорганизмов, проявляющих устойчивость к одному или нескольким антибиотикам. Такие инфекции труднее лечить, повышается уровень заболеваемости и смертности, увеличивается длительность госпитализации [1–4]. Наиболее оптимальным решением проблемы резистентности является изыскание новых биологически активных веществ среди вторичных метаболитов микробного происхождения. Для повышения продуктивности штаммов применяют мутагенез с последующим скринингом и отбором вариантов с лучшими антимикробными параметрами [5–7].

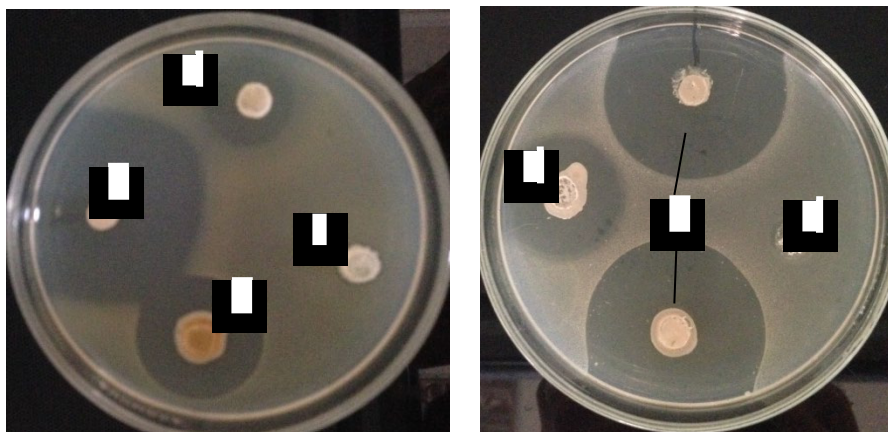
Из образцов ризосферы растения синеголовник (*Eryngium planum*) выделено в чистую культуру 78 колоний актиномицетов и изучены их антагонистические свойства в отношении лабораторных коллекционных штаммов: грамположительных (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) и грамотрицательных (*Comamonas terrigena* ATCC 8461) тест-микроорганизмов методом агаровых блоков. Инкубирование бактериальных тестов проводили при температуре 37 °С в течение 24 часов. Результат учитывали по величине диаметра зоны подавления роста вокруг агаровых блоков. Наибольший интерес представил изолят С32 с широким спектром действия: зона подавления роста *Bacillus subtilis* ATCC 6633 составила 30 мм, тест-культуры *Comamonas terrigena* ATCC 8461 – 28 мм.

Проведена селекция штамма методом физического мутагенеза (УФ-облучение) по методу Дж. Миллера [8]. Для проведения мутагенеза мицелий 5–7-дневной культуры смывали с поверхности агаризованной среды стерильной водой и фильтровали через ватный фильтр для отделения крупных конгломератов мицелия. Затем суспензию фильтровали через стеклянный фильтр (размер пор-100 мкм). Суспензию спор (10^6) асептично разливали по 5 мл в стерильные чашки Петри и устанавливали под ультрафиолетовой лампой на расстоянии 15 см. УФ-источником излучения служила бактерицидная лампа типа TUV30W LL, (BTA 30L31 Philips).

Облучение суспензии спор проводили в течение 5–240 секунд при постоянном перемешивании, после чего чашки выдерживали в темноте в течение 2 ч во избежание фотореактивации. После проведения индуцированного ненаправленного мутагенеза, отобранные пробы разводили так, чтобы на чашках Петри с агаризованными средами после их посева не образовывалось более 100 колоний. На чашки Петри с картофельным агаром наносили по 0,1 мл и равномерно распределяли по всей поверхности агара. Чашки инкубировали в течение 7–10 суток при температуре $28^{\circ}\pm 1^{\circ}$ С в изолированном от света месте. В качестве контроля использовали необлученную суспензию. Степень выживаемости определяли, как отношение числа выросших колоний после проведения мутагенеза, к количеству колоний до его проведения.

Частоту проявления мутаций определяли, как отношение числа колоний с изменённой морфологией (по сравнению с морфологией контрольных колоний), к числу колоний, не изменивших свою морфологию. В результате проведенных экспериментов обнаружено 4 различных морфологических формы колоний, отличающихся друг от друга не только скоростью роста, но и различной пигментацией и наличием воздушного мицелия. Все виды возникающих морфологических форм протестированы на антагонистическую активность методом агаровых блоков в отношении *Staphylococcus aureus* 209 Р и *E.coli* (рисунок 1).

Установлено, что активность большинства полученных вариантов соответствует активности контроля. Наименьшая активность минус-варианта составила 75 % от активности контроля. Колонии со скудным воздушным мицелием не проявили антагонистической активности (рисунок 1, вариант 4). При УФ-облучении в течение 240 секунд выделен активный клон, превышающий активность родительского штамма в 2–2,5 раза (рисунок 1, вариант 2).



S. aureus 209 P

E. coli

Рисунок 1 – Антибиотическая активность клонов изолята С32. 1-родительский штамм; 2–4 мутантные штаммы после УФ облучения (240 сек)

В результате проведенных исследований получен новый продуцент антибиотика широкого спектра действия СМ 32, перспективный для дальнейших исследований, с целью получения нового природного антибиотика для медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журавков Ю.Л., Королева А.А., Станишевский А.Л. Проблема антибиотикотерапии резистентных инфекций на современном этапе // Военная медицина. – 2013. – № 2. – С. 110–119.
2. Таточенко В.К. Резистентность к антибиотикам и как ее преодолеть // Педиатрическая фармакология. 2017. Т. 14, № 6. С. 514–519.
3. Shallcross L.J., Davies S.C. The World Health Assembly resolution on antimicrobial resistance // J Antimicrob Chemother. – 2014. – V. 69, № 11. – P. 2883–2885.
4. Livermore D.M. Fourteen years in resistance // Int J Antimicrob Agents. 2012. V. 39, № 4. P. 283–294.
5. Яковлева М.Б., Никитина З.К. Скрининг-методы в биотехнологии. Выявление микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – № 5. – С. 35–43.
6. Baltz R.H. Spontaneous and induced mutations to rifampicin, streptomycin and spectinomycin resistances in actinomycetes: mutagenic mechanisms and applications for strain improvement // J Antibiot (Tokyo). 2014. V.67, № 9. P. 619–624.
7. Adep K. Kumar. UV mutagenesis treatment for improved production of endoglucanase and β -glucosidase from newly isolated thermotolerant actinomycetes, *Streptomyces griseoaurantiacus* // Bioresources and Bioprocessing. – 2015. – № 2. – P.22
8. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике // Дж. Миллер. – М.: Мир. 1976. – 440 с.