

# ИЗМЕНЕНИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СТРЕПТОМИЦЕТОВ ПОЧВ МОЛДОВЫ, ВЫРАЩЕННЫХ НА СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА

*Светлана БУРЦЕВА, Максим БЫРСА,*

*Технический Университет Молдовы*

*Владимир ШЕПТИЦКИЙ,*

*Молдавский государственный университет*

*Юлия БЕРЕЗЮК, Анастасия ВАСИЛЬЧУК,*

*Приднестровский университет им. Т. Г. Шевченко*

Изучена способность штаммов стрептомицетов, выделенных из почв Молдовы, к накоплению в биомассе липидов и аминокислот в зависимости от состава питательной среды. Установлено, что изучаемые штаммы лучше растут на комплексных средах, из проверенных штаммов больше всего биомассы ( $\approx 20$  г) образует штамм *Streptomyces gougerotii* CNMN-Ac-14 (66) на среде M-1, максимальное количество липидов ( $\approx 13.5\%$ ) было обнаружено у штамма *Streptomyces sp.* 49 при росте на среде M-1, фосфолипидная фракция ( $\approx 17.2\%$ ) в максимальном количестве содержалась в биомассе штамма *Streptomyces sp.* 49 при росте на среде R, стериоловая фракция ( $\approx 15\%$ ) – у штамма *Streptomyces gougerotii* CNMN-Ac-14 (66) при росте на среде M-1. Изучение аминокислотного состава показало, что исследуемые штаммы синтезируют 19 аминокислот, суммарное количество незаменимых аминокислот составляет 35-40%.

**Ключевые слова:** *Streptomyces, питательная среда, биомасса, липиды, аминокислоты.*

## CHANGES IN THE BIOSYNTHETIC ACTIVITY OF STREPTOMYCETES IN THE SOILS OF MOLDOVA GROWN ON MEDIA OF DIFFERENT COMPOSITION

The ability of streptomycete strains isolated from the soils of Moldova to accumulate lipids and amino acids in biomass, depending on the composition of the nutrient medium, was studied. It was found that the studied strains grow better on complex media; of the tested strains, the most biomass ( $\approx 20$  g) is formed by the *Streptomyces gougerotii* CNMN-Ac-14 (66) strain on M-1 medium; the maximum amount of lipids ( $\approx 13.5\%$ ) was found in the strain *Streptomyces sp.* 49 during growth on M-1 medium, the phospholipid fraction ( $\approx 17.2\%$ ) was contained in the maximum quantity in the biomass of the strain *Streptomyces sp.* 49 when growing on R medium, the sterol fraction ( $\approx 15\%$ ) – in the *Streptomyces gougerotii* CNMN-Ac-14 (66) strain when growing on M-1 medium. The study of amino acid composition showed that the studied strains synthesize 18-19 amino acids, the total amount of essential amino acids is 35-40%.

**Keywords:** *Streptomyces, nutrient medium, biomass, lipids, amino acids.*

### **Введение**

Стрептомицеты примечательны своими выраженнымми биосинтетическими свойствами: они обладают способностью к образованию множества физиологически активных веществ: антибиотиков, витаминов, ферментов, липидов, аминокислот, фитогормонов и пр., стимулирующих рост и развитие сельскохозяйственных животных и растений. Эти соединения находят применение в различных сферах жизни: фармацевтической промышленности, медицине, сельском хозяйстве, в том числе растениеводстве и ветеринарии [1, 2, 3]. Поиск активных продуцентов, исследование влияния условий культивирования для направленного синтеза различных биологически активных веществ, изучение

состава полученной биомассы – важные шаги для исследователей, предлагающих биомассу почвенных стрептомицетов как источник различных соединений для применения в сельском хозяйстве, фармации и пр.

Стрептомицеты наиболее широко распространены в почве, где могут составлять до 40,0% от общего количества почвенных бактерий. В составе биомассы стрептомицетов содержится большое количество насыщенных жирных кислот, сложные полярные липиды – дифосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол [4]. Исследованием [5] показано наличие насыщенных и ненасыщенных жирных кислот с четным и нечетным числом углеродных атомов от C<sub>14</sub> до C<sub>18</sub> в биомассе штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (36).

**Цель исследований** – изучение состава биомассы штаммов стрептомицетов, выделенных из почв Молдовы, при их культивировании на средах разного состава.

### **Материалы и методы.**

Объектом исследования были штаммы, выделенные из почвы центральной части Республики Молдовы: *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (19), *Streptomyces plicatus* CNMN-Ac-13 (33), *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (36), *Streptomyces gougerotii* CNMN-Ac-14 (66), а также неидентифицированные штаммы *Streptomyces spp.* 12, 49, 205 не идентифицировали.

Штаммы *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 были идентифицированы совместно с сотрудниками Института Микробиологии и Вирусологии НАН Украины (г. Киев). Штаммы *Streptomyces plicatus* CNMN-Ac-13 и *Streptomyces gougerotii* CNMN-Ac-14 были идентифицированы совместно с сотрудниками Института Биохимии и Физиологии Микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН (г. Пущино).

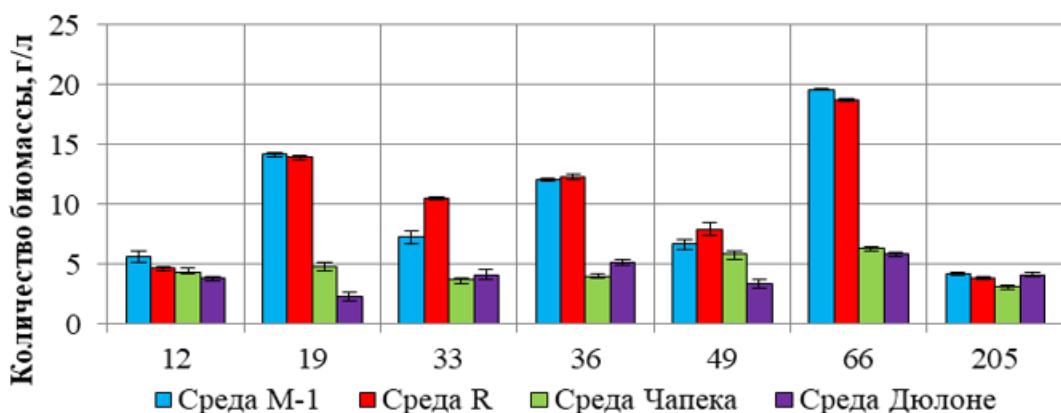
Культуры хранили двумя способами: методом периодических пересевов, используя 3 агаризованных среды – среду Чапека, среду Гаузе и овсяный агар, а также в лиофильном виде.

Для проведения исследования по изучению состава биомассы готовили инокулум, выращивая каждый из штаммов на жидкой синтетической среде Дюлоне с глюкозой в течение 3-х дней на вибростоле (180-200 об/мин) в конических колбах, далее культивирование вели на жидких средах: синтетических с глюкозой – среда Чапека, Дюлоне, комплексных – среда R [6], M-1 [7], содержащих в качестве основных источников углерода и азота - крахмал, кукурузную муку и нитрат аммония. Культивирование вели при +27°C на вибростоле (180-200 об/мин) в течение 5 дней, далее биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (5000 об/мин в течение 20 мин). Количество биомассы определяли гравиметрическим методом. Затем проводили экстракцию липидов из биомассы методом Фолча в модификации, описанной в работе [8]. Качественный и количественный состав липидов определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинах “Sorbfil” и денситометрически, описанным в работе [9].

Для подготовки проб биомассы изучаемого штамма для определения аминокислотного состава использовали метод гидролиза 6N-соляной кислотой [10, с. 63]. Пробу взвешивали и количественно переносили в пробирки из пирекса или сиала, куда добавляли 6N-соляную кислоту в двухкратном избытке. Пробирки запаивали, а затем комплексные пробы выдерживали в воздушном термостате при 110±10°C в течение 24 часов. После гидролиза пробирки охлаждали, содержимое пробирок количественно переносили и фильтровали. Кислоту в полученной жидкости испаряли в вакуумном роторном испарителе при 400°C до pH=2,2. Аминокислотный состав полученной биомассы определяли методом ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе AAA-339 M „Microtehnă“ (Чехия).

### **Результаты и их обсуждение.**

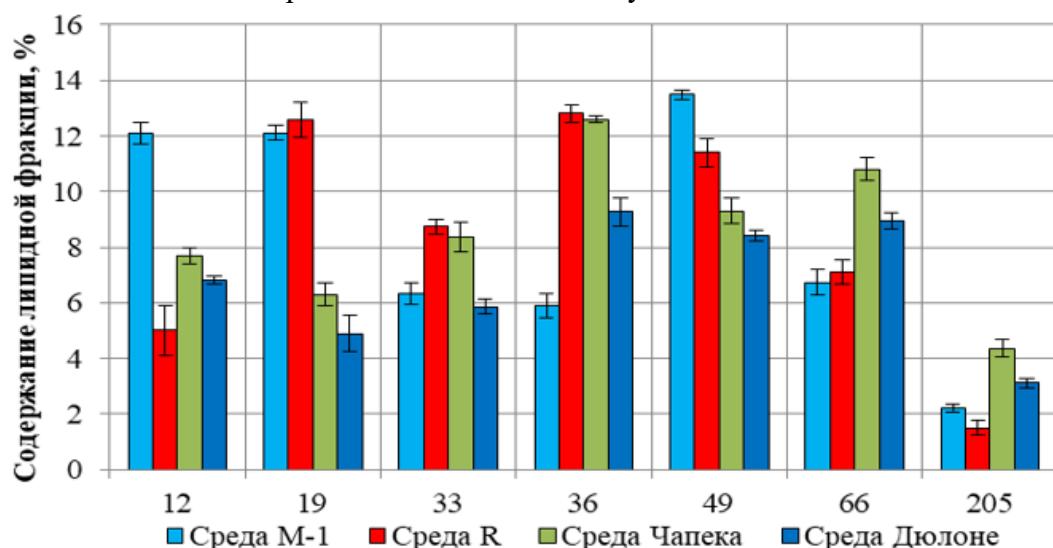
На начальном этапе исследования изучали количество биомассы при культивировании на средах разного состава (синтетические среды – Дюлоне и Чапека, и комплексные среды - M-1 и R). Анализируя данные, выяснили, что накопление биомассы при росте на комплексных средах (R и M-1) в 2-3 раза выше, чем на синтетических.



**Рисунок 1. Изменение количества биомассы штаммов стрептомицетов при культивировании на разных средах**

Наиболее продуктивным оказался штамм *Streptomyces gougerotii* CNMN-Ac-14 (66): на комплексной среде M-1 количество биомассы составило  $19,62 \pm 0,07$  г/л, а на среде R –  $18,72 \pm 0,14$  г/л. У штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (19) количество биомассы при росте на среде M-1 было  $14,15 \pm 0,21$  г/л, а на среде R –  $13,46 \pm 0,52$  г/л. Минимальная продуктивность при росте как на комплексных, так и на синтетических средах наблюдалась у штамма *Streptomyces sp.* 205. Невысокая биосинтетическая активность выявлена у практических всех штаммов при росте на синтетической среде Дюлоне (Рис. 1).

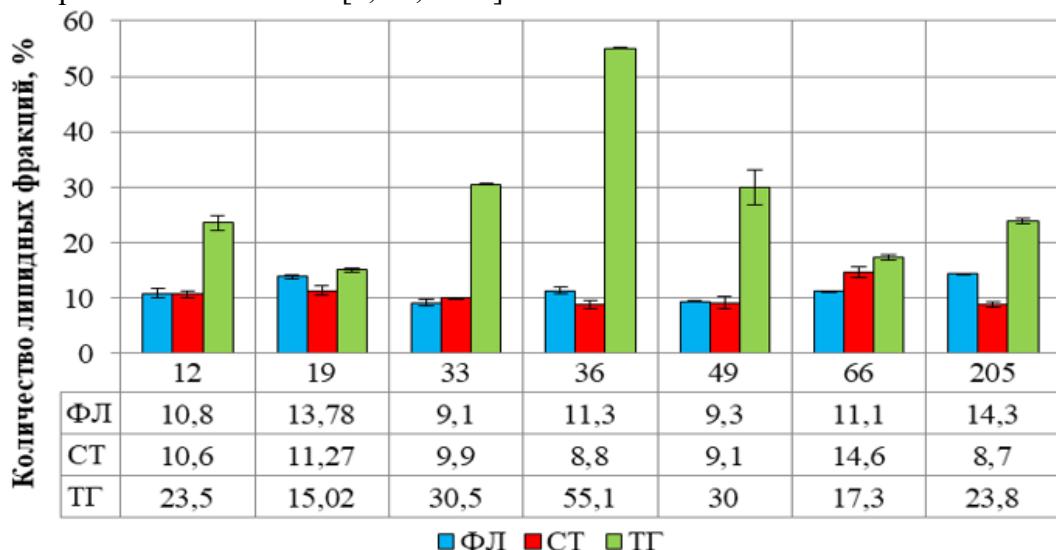
Известно, что биомасса стрептомицетов содержит большое количество липидов – до 40,0% и более в зависимости от условий культивирования и особенностей организма [2]. Оценка способности изучаемых штаммов к липидообразованию показала следующее.



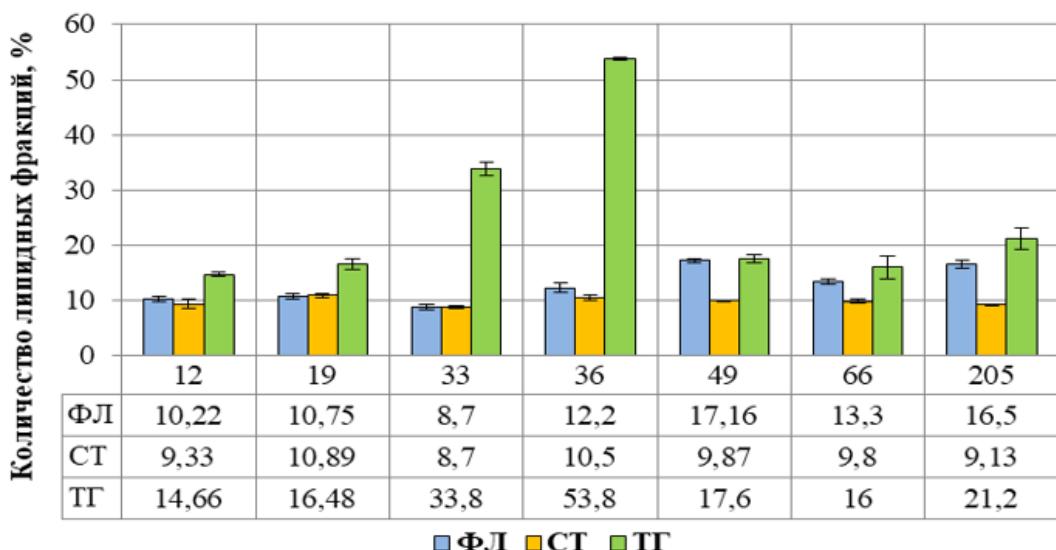
**Рисунок 2. Количество липидов в биомассе стрептомицетов, выращенных на средах разного состава**

На рис. 2 видно, что у штамма *Streptomyces gougerotii* CNMN-Ac-14 (66) было отмечено выраженное накопление липидов в биомассе при росте на синтетических средах:  $10,81 \pm 0,39\%$  – на среде Чапека и  $8,94 \pm 0,29\%$  – на среде Дюлоне. Также продуктивным оказался штамм *Streptomyces sp.* 49: в биомассе содержалось  $13,51 \pm 0,17$  и  $11,41 \pm 0,50\%$  липидов при культивировании на комплексных средах M-1 и R соответственно. Способность к липидообразованию при росте на комплексных средах оказалась высокой у штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (19). При культивировании данного штамма на комплексных средах M-1 и R количество липидов биомассы составило  $12,11 \pm 0,27$  и  $12,85 \pm 0,55\%$ , соответственно.

Далее определяли фракционный состав липидов биомассы, полученной при культивировании исследуемых штаммов на комплексных (M-1 и R) и синтетических (Чапека и Дюлоне) средах. Известно, что фосфолипиды стрептомицетов могут стабилизировать систему антиоксидантной защиты организма, стериновая фракция проявляет иммуностимулирующее действие, особенно в комплексе с полисахаридами и фосфолипидами, а триглицериды являются поставщиками энергии. Также известно, что фосфолипиды стрептомицетов отличаются высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, которые, в свою очередь, важны как для самих микроорганизмов, так и при применении их биомассы в различных областях [2, 11, с. 28].



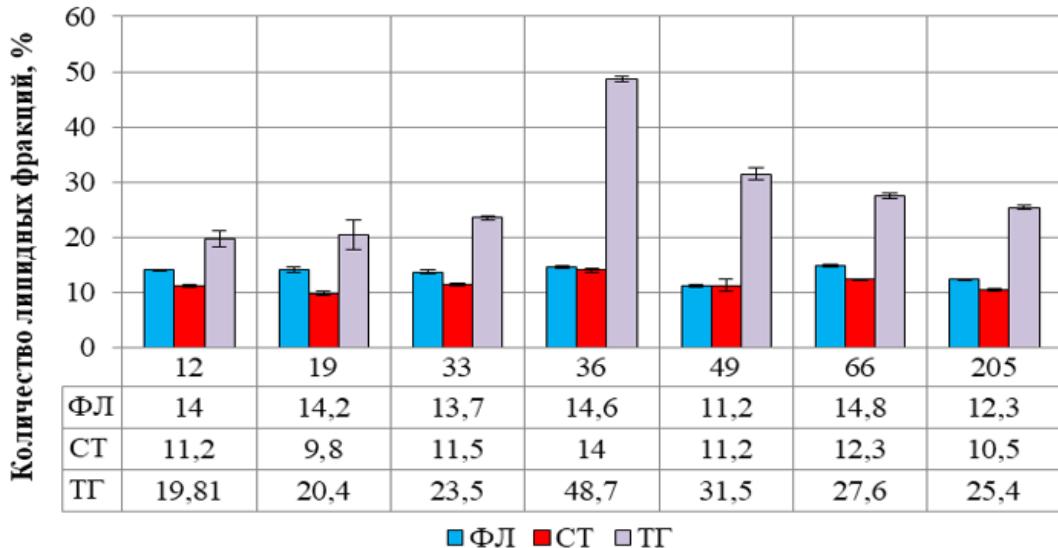
**Рисунок 3. Содержание основных липидных фракций (фосфолипиды, стерины, триглицериды) в липидах биомассы стрептомицетов, выращенных на среде M-1**



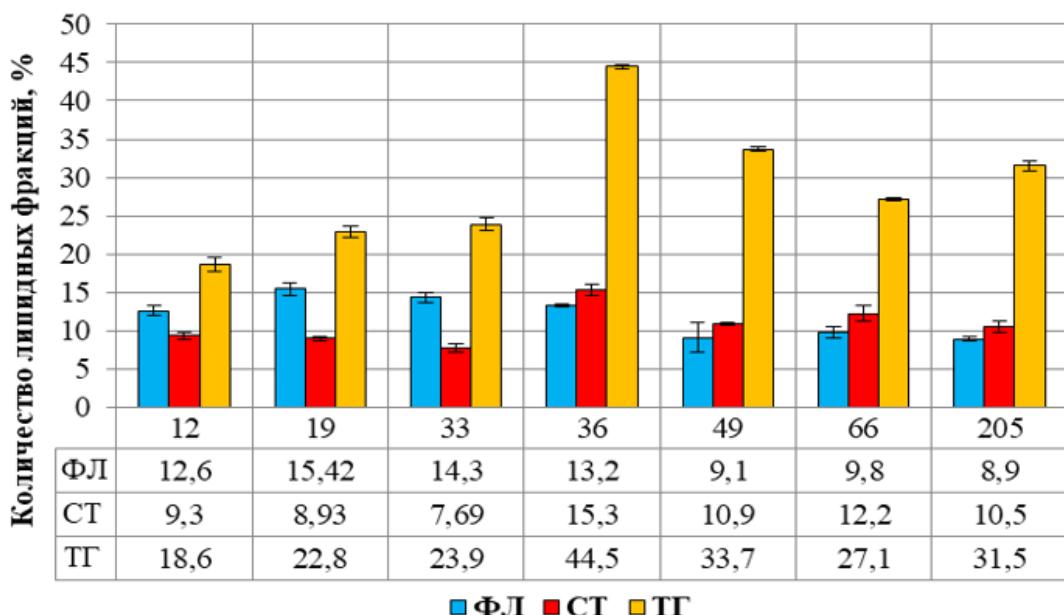
**Рисунок 4. Количество основных липидных фракций (фосфолипиды, стерины, триглицериды) в липидах биомассы штаммов стрептомицетов, выращенных на среде R**

Замечено, что количество основных физиологически активных липидных фракций (ФЛ, СТ) было разным в зависимости от состава питательной среды. Рис. 3-6 показывают, что содержание фосфолипидной фракции было максимальным в липидах биомассы штаммов *Streptomyces sp.* 12, *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (19), *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (36), культивируемых на синтетических средах Чапека и Дюлоне, также было отмечено высокое содержание фосфолипидов у штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (19), *Streptomyces gougerotii* CNMN-Ac-14 (66), *Streptomyces spp.* 49, 205, выращенных на комплексных средах M-1 и R. Наибольшее содер-

жение стериновой липидной фракции выявлено в липидах биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (19) при росте на комплексных средах M-1 и R, а также высокая биосинтетическая активность в отношении синтеза стеринов наблюдалась у штаммов *Streptomyces gougerotii* CNMN-Ac-14 (66) и *Streptomyces sp.* 12 при их росте на комплексных и синтетических средах.



**Рисунок 5. Содержание основных липидных фракций (фосфолипиды, стерины, триглицериды) в липидах биомассы стрептомицетов, культивированных на среде Чапека**



**Рисунок 6. Количество основных липидных фракций (фосфолипиды, стерины, триглицериды) в липидах биомассы стрептомицетов, полученных при росте на среде Дюлоне**

Содержание триглицеридов составило от 14,7% (*Streptomyces sp.* 12 при росте на среде R) до 55,1% (*Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (36) при росте на среде M-1). Максимальная продуктивность в отношении синтеза триглицеридов отмечена у штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (36) при росте на всех видах питательных сред, также высокие биосинтетические возможности для этой липидной фракции показали штаммы *Streptomyces plicatus* CNMN-Ac-13 (33) и *Streptomyces sp.* 49.

Далее изучали аминокислотный состав биомассы штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (19) и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (36) как наиболее перспективных продуцентов. Было обнаружено содержание 19 аминокислот. Исследования показали, что качественный аминокислотный состав биомассы изученных штаммов идентичен, а количество зависит от среды культивирования и от

штамма. Например, при сравнении аминокислотного состава биомассы штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (19) и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (36), культивированных на питательной среде R, выяснили, что в полученной биомассе суммарное содержание аминокислот составило около 300 мг/г и 250 мг/г соответственно (Таблица 1). Общее количество заменимых аминокислот (синтезируются макроорганизмом) в биомассе штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (19) составило 65% от общего количества, а незаменимых (лизин, гистидин, метионин, треонин, лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин) – около 33%, тогда как у *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (36) – 52% и 47% соответственно. Содержание иммуноактивных аминокислот (треонин, валин, триптофан, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, серин, аланин, цистин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота) в биомассе штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (19) и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (36) составило около 62% и 48% от общего количества соответственно. Все они формируют иммуноактивные белки организма, участвуют в образовании специфических антител, ускоряют производство Т-лимфоцитов [12, с. 68].

**Таблица 1. Суммарное содержание аминокислот в биомассе штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (19) и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (36) при культивировании на комплексной среде R**

Сумма аминокислот	<i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ac-11 (19)	<i>Streptomyces massasporeus</i> CNMN-Ac-06 (36)
$\Sigma$ аминокислот	291,1 $\pm$ 3,1	246,8 $\pm$ 0,2
$\Sigma$ заменимых аминокислот	189,3 $\pm$ 0,8	128,0 $\pm$ 0,9
$\Sigma$ незаменимых аминокислот	96,8 $\pm$ 0,2	115,2 $\pm$ 0,1
$\Sigma$ иммуноактивных аминокислот	179,3 $\pm$ 0,7	118,5 $\pm$ 0,2
$\Sigma$ гликогенных аминокислот	99,8 $\pm$ 1,8	83,1 $\pm$ 0,4
$\Sigma$ кетогенных аминокислот	57,2 $\pm$ 0,2	75,6 $\pm$ 0,1
$\Sigma$ протеиногенных аминокислот	286,1 $\pm$ 0,2	243,2 $\pm$ 0,5
$\Sigma$ серосодержащих аминокислот	14,5 $\pm$ 1,2	10,7 $\pm$ 0,4

Среди аминокислот наибольшее количество наблюдалось у глутаминовой кислоты – 27-29% от общего количества, аланина – аминокислоты с иммуностимулирующим действием – около 12%. Незаменимая аминокислота лейцин была в наибольшем количестве – около 9% от общей массы аминокислот. Содержание незаменимых аминокислот в биомассе стрептомицетов важно тем, что они не могут самостоятельно синтезироваться в организме животных и человека, поэтому необходимо обеспечить их поступление с пищей [12, с. 23].

Биомасса изучаемых штаммов может служить основой для получения кормовых препаратов для животноводства, использующихся с целью стимуляции роста сельскохозяйственных животных и птицы. Экспериментально было показано, что биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (19), полученная при разных условиях культивирования, положительно повлияла на рост и общее развитие организма теплокровных животных (крыс), их репродуктивные показатели. В обычных условиях добавление к основному рациону питания биомассы штамма стрептомицетов привело к увеличению массы тела опытных животных на 23,0–26,0% больше по сравнению с контрольными. Кроме того, при исследовании fertильности добавление биомассы в корм способствовало увеличению количества родившихся крысят на 1 самку (на 3,33 новорожденных), также в опытной группе не было зафиксировано ни одного летального исхода [13].

## Выводы

Таким образом, штаммы стрептомицетов, выделенные из почв Молдовы обладают биосинтетическим потенциалом, выраженным в разной степени. Отличительной особенностью стрептомицетов является разнообразный биохимический состав биомассы, который может меняться при разных условиях роста, в частности, при изменении состава среды культивирования. Биомасса стрептоми-

цетов содержит биологически активные липидные соединения и аминокислоты, в том числе, незаменимые, что может лежать в основу ее использования в качестве биопрепарата для увеличения массы тела, плодовитости и стрессоустойчивости теплокровных животных.

### **Библиография:**

1. БОЛОРМАА, Ч., ТАЗЕТДИНОВА, Д. И., АЛИМОВА, Ф. К. Характеристика *Streptomyces* из пустынных почв Монголии. В: *Фундаментальные исследования*, 2012, nr 9, с. 545-549.
2. БУРЦЕВА, С. А. Биологически активные вещества стрептомицетов (биосинтез, свойства, перспективы применения) / Автореферат диссертации доктора хабилитат биологии. Кишинев, 2002. 35 с.
3. CHATER, K. F., BIRO, S., LEE, K. J., PALMER, T., SCHREMPF, H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. In: *FEMS Microbiological Reviews*, 2010, nr 34, p. 171–198.
4. HASANI, A., KARIMNIK, A., ISSAZADEH K. *Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities*. In: *International Journal of Advanced Biological & Biomedical Research*, 2014, v. 2, p. 63-75.
5. БРАТУХИНА, А. Естественная изменчивость и биосинтетическая активность актиномицетов *Streptomyces massasporae* / Автореферат диссертации доктора биологии. Кишинев, 2012. 32 с.
6. РЫСБАХОВ, К. Р. Использование хлопкового шрота в средах для биосинтеза антибиотика гризина. В: Антибиотики, витамины и стимуляторы микробного происхождения. Труды института Микробиологии и Вирусологии АН Казахской ССР, 1974, Алма-Ата, Наука, том 19, с. 57-63.
7. BURȚEVA, S. A. Biosynthesis of lipids and fatty acids by streptomycetes. In: *Roumanian Biotechnological Letters*, 1999, nr. 4(6), p. 535-540.
8. BURȚEVA, S., USATII, A., TODERAŞ, A. Variabilitatea formelor spontane ale tulpiii *Streptomyces* sp. 36 producatoare de substanțe bioactive. În: *Buletinul AŞM. Seria Științe biologice și chimice*, 1996, nr. 4, p. 27-32.
9. ПОСТОЛАКИЙ, О. М., БУРЦЕВА, С. А. Влияние миллиметрового излучения на рост и липидообразование *Streptomyces canosus CNMN-Ac-02* и его вариантов. В: Электронная обработка материалов, 2009, nr. 2(259), с. 93-97. Доступно: <https://eom.usm.md/index.php/journal/article/view/930/852> / [Просмотрено: 27.01.2025]
10. КОЗАРЕНКО, Т. Д., ЗУЕВ, С. Н., МУЛЯР, Н. Ф. Ионообменная хроматография аминокислот (теоретические основы и практика). Новосибирск: Наука, 1981. 157 с.
11. КОВАЛЬЧУК, Л. П., ДОНЕЦ, А. Т., БУРЦЕВА, С. А. Липиды актиномицетов. Кишинев: Штиинца, 1979. 104 с.
12. ГАРАЕВА, С. Н., РЕДКОЗУБОВА, Г. В., ПОСТОЛАТИЙ, Г. В. Аминокислоты в живом организме. Chișinău: AŞM, 2009. 552 с.
13. БЕРЕЗЮК, Ю. Биосинтетические свойства *Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11* и физиологические эффекты биомассы на организм теплокровных животных (крыс) / Автореферат диссертации доктора биологии. Кишинев, 2019. 30 с.

**Благодарность:** Исследования были проведены при поддержке Правительства Республики Молдова, Министерства Образования и Исследований, субпрограмма исследований 020101 “InBioS – Soluții biotecnologice inovative pentru agricultură, medicină și protecția mediului”. Контракт институционального финансирования nr. 4/FI от 22 февраля 2024.

### **Данные об авторах:**

**Юлия БЕРЕЗЮК**, доктор биологических наук, доцент, Приднестровский университет им. Т. Г Шевченко.

**ORCID:** 0009-0006-4649-6381

**E-mail:** ulia203@mail.ru

**Светлана БУРЦЕВА**, доктор хабилитат биологических наук, профессор-исследователь, главный научный сотрудник, Институт Микробиологии и Биотехнологии Технический Университет Молдовы.

**ORCID:** 0000-0001-7412-7897

**E-mail:** svetlana.burteva@imb.utm.md

**Максим БЫРСА**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Институт Микробиологии и Биотехнологии, Технический Университет Молдовы.

**ORCID:** 0000-0003-3068-1719

**E-mail:** maxim.birsa@imb.utm.md

**Анастасия ВАСИЛЬЧУК**, старший преподаватель, Приднестровский университет им. Т. Г. Шевченко.

**ORCID:** 0009-0001-8325-8730

**E-mail:** vasilchuk2009@mail.ru

**Владимир ШЕПТИЦКИЙ**, доктор хабилитат биологических наук, доцент-исследователь, главный научный сотрудник, Институт Физиологии и Санокреатологии, Молдавский государственный университет.

**ORCID:** 0000-0002-6306-7021

**E-mail:** septitchi@mail.ru

*Получено: 06.03.2025*