

К. А. ВИНОГРАДОВА, В. И. ДУДА, Э. З. МОНОСОВ, Л. С. ВАСИЛЬЕВА

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ АНТИБИОТИКА ГЕЛИОМИЦИНА В КОЛОНИЯХ
И МИЦЕЛИИ ACTINOMYCES VARIABILIS
И ACTINOMYCES OLIVOCINEREUS**

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 2 VIII 1973)

Люминесцентный анализ нашел широкое применение в микробиологии (1). Большие возможности в этом плане представляет собственная люминесценция актиномицетов, связанная с биосинтезом антибиотиков (2, 3). Это явление до сих пор не использовалось при изучении строения колоний актиномицетов и определения локализации в них антибиотиков. С помощью люминесцентной микроскопии было показано, что антибиотики флавофунгин и гелиомицин сконцентрированы на отдельных участках мицелия актиномицета-продуцента в виде гранул (4). Однако в этих работах не рассматривается вопрос о локализации антибиотика в колониях продуцентов, так как примененный авторами метод отпечатков не дает возможности получить достоверные сведения о нахождении антибиотика в поверхностных и глубинных слоях колонии, а также в питательной среде, окружающей мицелий.

Культуры *Actinomyces olivocinereus* — продуцента антибиотика № 11—98 типа гелиомицина и *Act. variabilis* — продуцента гелиомицина, способны к яркой специфической собственной люминесценции при фотозвуждении. В данном случае это свечение обусловлено содержанием в культурах актиномицетов-продуцентов люминесцирующего антибиотика гелиомицина (3). В настоящей работе приводятся экспериментальные данные о локализации антибиотика гелиомицина в колониях и мицелии актиномицетов, его синтезирующих.

Объектом исследования были продуценты антибиотика № 11—98 типа гелиомицина *Act. olivocinereus*, штаммы № 11—98 и № 110—2 из коллекции лаборатории антибиотиков Биологического факультета Московского государственного университета, и продуцент гелиомицина *Act. variabilis*, полученный из Института по изысканию новых антибиотиков Академии медицинских наук СССР *. Исследованиям подверглись культуры различного возраста, выращенные на агаризованной среде № 1 Гаузе (6). Срезы и сколы колоний просматривали в стереоскопическом (МБС-1) и люминесцентном (МЛ-2) микроскопах. Сколы колоний получали следующим образом. Вырезали бритвой агаровые блоки в виде квадратов со стороной 10 мм и толщиной 5 мм. Блоки помещали в чашеобразную медную пластинку (диаметром 10 см), которую погружали на несколько минут в жидкий азот. После замораживания раскалывали блоки путем надавливания на край агарового квадрата скальпелем, предварительно охлажденным в жидком азоте. Для микроскопии отбирали те блоки, у которых скол прошел через центр колонии. Затем агаровые блоки помещали на предметные стекла вверх поверхностью скола, и после размораживания проводили микроскопический анализ. Локализацию антибиотика в клетках продуцентов изучали с помощью обычного светового, фазово-контрастного, люминесцентного и электронного микроскопов. Для электронной микроскопии мицелий фиксировали по методу Ритер — Келленбергера, затем заливали в аралдит и делали ультратонкие срезы на ультратоме LKB-4800. Докраску срезов проводили цитратом свинца по Рейнольдсу.

* Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам Института по изысканию новых антибиотиков АМН СССР за любезное предоставление культуры.

Количество антибиотиков в разных слоях колонии определяли спектрофотометрически на СФ-4. Для этого кусочки мицелия из разных слоев колонии отбирали препаровальной иглой под микроскопом МБС-1 и уравнивали по весу. Антибиотик из этого материала экстрагировали этилацетатом. Значения рН в разных слоях колонии определяли на рН-метре (рН-340) с помощью торцевого микроэлектрода.

При наблюдении в стереоскопический микроскоп сколов и срезов колоний *Act. olivocinereus* видно четкое разделение колоний на слои. В воздушном мицелии различаются 2 слоя: нижний розовый с каплями экссудата, неспороносный, и расположенный над ним серый спороносный мицелий. Субстратная часть колонии имеет форму плосковыпуклой линзы. По периферии ее расположен резко очерченный слой оливкового цвета, толщина которого на поверхности агара в 2—3 раза больше, чем в глубине. Внутренний слой субстратной части колонии окрашен в коричневый цвет. В люминесцентном микроскопе выявляется четкая дифференциация вышеописанных слоев по характеру собственной люминесценции (рис. 1). Серый спороносный мицелий светится зеленым, следующий под ним слой неспороносного мицелия в верхней части имеет желтое, а в нижней — буровато-желтое свечение. Периферический оливковый слой субстратной части колонии при фотовозбуждении обладает ярко-оранжевой люминесценцией, тогда как внутренняя ее область светится интенсивным зеленым цветом. Весьма интересно, что между воздушным и субстратным мицелием под у.-ф. лучами заметна темная несветящаяся прослойка. Такая же прослойка наблюдается и между периферическим слоем с ярко-оранжевой люминесценцией и внутренним слоем субстратного мицелия. Периферический оранжевый слой в глубине агара имеет в 3—4 раза меньшую толщину и обладает менее интенсивным свечением по сравнению с той его частью, которая расположена параллельно поверхности плотной среды.

Просмотр большого числа колоний *Act. olivocinereus* №№ 11—98 и 110—2 показал, что не во всех колониях воздушный мицелий обладает желтым свечением. В некоторых случаях, так же как и в колониях *Act. variabilis*, воздушный мицелий (за исключением зеленого спороносного слоя) под у.-ф. лучами был темным. Уместно отметить, что изучение локализации антибиотика необходимо проводить прежде всего на сколах, а не на срезах колоний, так как при получении срезов с помощью бритвы различные слои колонии (особенно в воздушном мицелии) могут сильно повреждаться и перемешиваться. Метод получения срезов путем заключения колоний в заливочные среды неприемлем уже потому, что в процессе обезвоживания и заливки может произойти вымывание антибиотика или его перераспределение в различных слоях колонии. Известно, что гелиомицин, продуцентами которого являются изучаемые культуры, экстрагируется этилацетатом. Спектрофотометрический анализ этилацетатных экстрактов из кусочка мицелия, собранных из разных слоев, доказал присутствие антибиотика в периферическом слое субстратной части колонии и в воздушном мицелии. При этом слой с ярко-оранжевой люминесценцией содержал антибиотика в 4—5 раз больше, чем воздушный мицелий. В слое субстратного мицелия с зеленой люминесценцией антибиотик отсутствовал. Интенсивность люминесценции, ее цвет находятся в зависимости от концентрации люминесцирующего вещества, его формы, рН среды (⁷), поэтому различия в люминесценции воздушного мицелия и периферического слоя субстратной части, очевидно, можно объяснить не только различной концентрацией в них антибиотика, но и различными физико-химическими условиями в этих слоях.

Антибиотик типа гелиомицина № 11—98 обладает индикаторными свойствами (⁵). В кислой среде (рН ≈ 6,5) он находится в недиссоциированной форме, имеет желтую окраску, а при фотовозбуждении люминесцирует красным цветом. В щелочной среде (рН ≈ 7,5) этот антибиотик находится в ионной форме, имеет оранжево-розовый цвет и желтую люминес-

ценцию. При измерении рН с помощью микроэлектрода оказалось, что значение рН воздушного мицелия, пропитанного экссудатом, равно 7,5, слой субстратного мицелия с ярко-оранжевой люминесценцией имел рН 6,2, а в центральной (внутренней) части субстратного мицелия с зеленой люминесценцией значение рН 8,0. Существование четко ограниченного слоя с ярко-оранжевой люминесценцией, отделенного темными про-

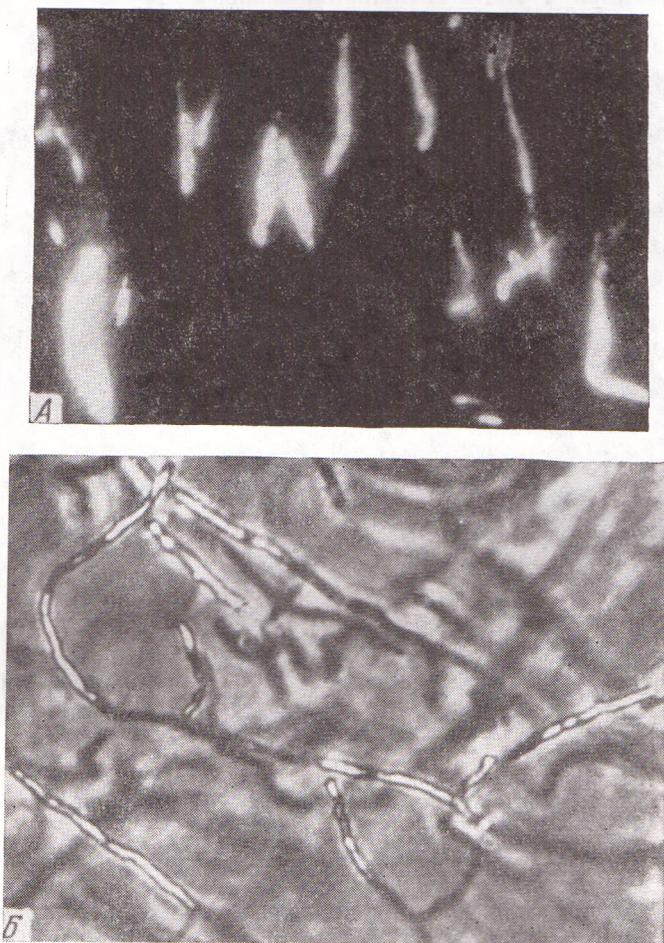


Рис. 2. *Act. variabilis*. Гифы из периферического слоя субстратного мицелия под люминесцентным (А) и фазово-контрастным (В) микроскопом. 2500 ×

слойками от остальных частей колонии, свидетельствует о том, что в этом слое идет синтез антибиотика и отложение его в местах образования. Иногда антибиотик имеется также и в воздушном мицелии.

Микроскопическое изучение мицелия из субстратной части с высокой концентрацией антибиотика показало, что в гифах мицелия имеются участки с ярко-оранжевой люминесценцией (рис. 1А). Эти участки, обладая высокой плотностью, выглядят в фазово-контрастном микроскопе как блестящие цилиндрические тельца, занимающие большую часть гиф (рис. 1В). Их толщина часто превышает диаметр гиф, поэтому последние выглядят раздутыми (особенно у *Act. olivocinereus* № 11—98 и 110—2). После экстракции этилацетатом ярко-оранжевая люминесценция блестящих телец исчезает. Под электронным микроскопом на тотальных препаратах эти тельца выглядят как гранулы с высокой электронной плотно-

стью, а на срезах (рис. 2) — как светлые крупные «вакуоли». При проводке объектов через спирты антибиотик почти полностью извлекается, лишь в некоторых вакуолях остаются небольшие гранулы вещества с высокой электронной плотностью. В тесном контакте с «вакуолями» находится сильно развитый внутрицитоплазматический мембранный аппарат, имеющий грубчато-везикулярное строение (рис. 2Б). Между мембранами трубок и везикул заметно отложение вещества, обладающего высокой

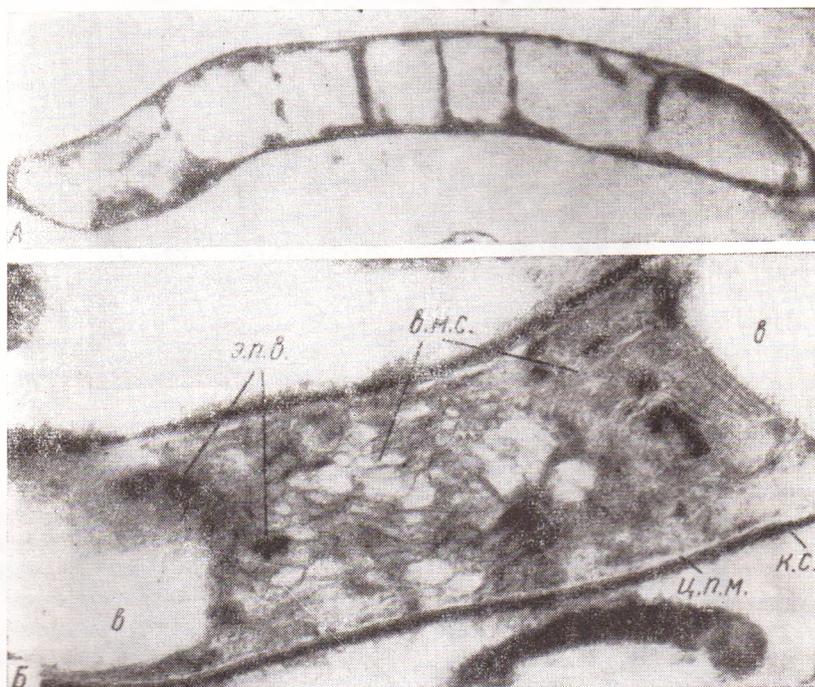


Рис. 3. *Act. olivocinereus*. Ультратонкие срезы клеток из периферического, содержащего антибиотик, слоя субстратного мицелия. А — 15 000 ×, Б — 45 000 ×. к.с. — клеточная стенка, ц.п.м. — цитоплазматическая мембрана, в.м.с. — внутрицитоплазматическая мембрана, в — «вакуоли» (с остатками электронноплотного вещества — э.п.в.)

электронной плотностью. Это подтверждает данные Курыловича и Малиновского⁽⁸⁾ об участии мембран в синтезе антибиотиков. При микроскопическом изучении центральной части колонии с зеленой люминесценцией обнаружено, что тельца с оранжевой и желтой люминесценцией в мицелии этого слоя полностью отсутствуют. Таким образом у *Act. olivocinereus* и *Act. variabilis* — продуцентов гелломицина антибиотик локализуется в колониях, главным образом в периферических слоях субстратного мицелия (рис. 3), отличающихся от других слоев значениями pH. Причины синтеза антибиотика именно в этом слое неясны; вероятно, этот процесс связан прежде всего с условиями аэрации.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
2 VIII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Н. Мейсель, Успехи микробиологии, т. 7, 3 (1971). ² Д. Г. Звягинцев, К. А. Виноградова и др., Микробиология, т. 33, 631 (1964). ³ В. А. Полторац, Научн. докл. высш. школы, биол. науки, т. 9, 130 (1972). ⁴ В. А. Полторац, В. И. Панкратова, Э. И. Кулалаева, Микробиология, т. 42, № 5 (1973). ⁵ К. А. Виноградова, В. А. Полторац и др., Антибиотики, т. 12, 558 (1967). ⁶ Г. Ф. Гаузе, Т. П. Преображенская и др., Вопросы классификации актиномицетов-антагонистов, М., 1957. ⁷ В. А. Зеленин, Взаимодействие аминопроизводных акридина с клеткой, «Наука», 1971. ⁸ В. Курылович, К. Малиновский, Микробиология, т. 41, 704 (1972).

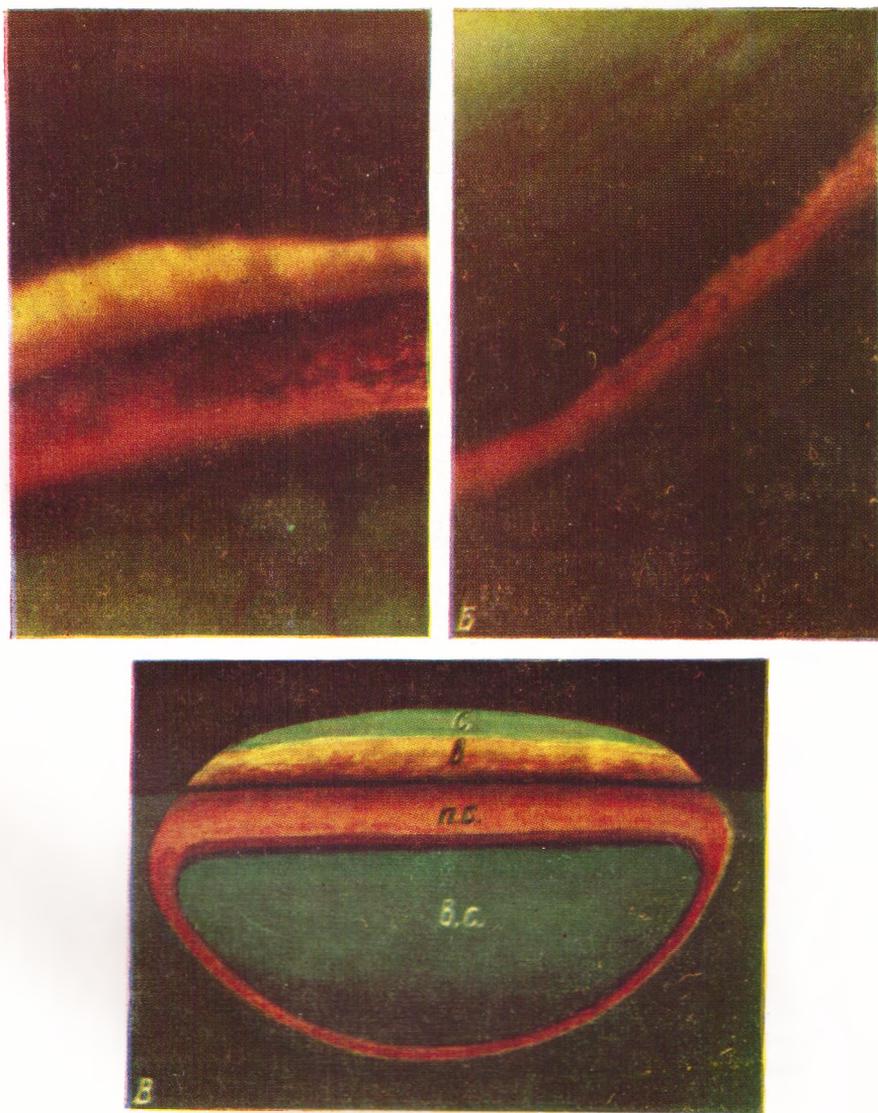


Рис. 1. Сколы колоний *Act. olivocinereus* № 11-98 в люминесцентном микроскопе. А, Б — микрофотографии. Увел. 20 \times ., В — схема строения колонии. с — спороносный слой, е — неспороносный слой воздушного мицелия, п.с. — периферический слой субстратного мицелия, в.с. — внутренний слой субстратного мицелия