

ТАКСОНОМИЧНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЩАМ *STREPTOMYCES SP. 11*

Севдалина Тодорова

Русенски университет „Ангел Кънчев“, Филиал – Разград, 7200 Разград, България,
e-mail: stodorova@uni-rise.bg

TAXONOMIC STUDIES ON A STRAIN OF *STREPTOMYCES SP. 11*

S.Todorova

Department of Biotechnologies and Food technologies, Ruse Angel Kanchev University – Razgrad
Branch, 7200 Razgrad, Bulgaria, e-mail: stodorova@uni-rise.bg

ABSTRACT

This work presents the results of taxonomic determination of the strain *Streptomyces sp. 11*. Based on the data obtained from studies of morphological, cultural and Physiological-biochemical properties of the strain *Streptomyces sp. 11* is referred to a series *Albosporus* of Gauze and is defined as *Streptomyces griseoloalbus*. The species is rare in the soils. The tested strain *Streptomyces sp. 11* exhibit antagonistic properties as inhibits the growth of bacteria and fungi.

Key words: *Streptomyces*; taxonomy characterization, antimicrobial activity

Сред описани 140 актиномицетни родове, само няколко са отговорни за мнозинството от над 20000 микробни естествени продукти, идентифицирани досега (Houssam et al., 2011). По-специален интерес за промишлеността и научните среди вече над 50 години представляват видовете от род *Streptomyces* (Anderson and Wellington, 2001). Те продуцират около 80% от актиномицетните природни биологично активни вещества, докладвани до сега (Bull and Stach, 2007), предимно антибиотици. Тези метаболити се използват широко не само в хуманната медицина, но и в животновъдството, хранителната промишленост, растениевъдството. Затова задълбочено се изследва биологията на актиномицети-антагонисти във връзка с търсенето и използването на активни биологични агенти, подтискащи растежа и развитието на фитопатогенните микроорганизми.

Целта на настоящата работа е проучване на антимицетната активност на изолиран от почва актиномицетен щам *Streptomyces sp. 11* и изследване на морфологичните, културални и физиолого-биохимични свойства на щама във връзка с таксономичното му определяне.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Изолиране на актиномицети от почва

За изолиране на чисти актиномицетни култури са използвани почвени проби от района на гр. Разград и е приложен рутинен метод на разреждане на почвата и посяване върху твърди хранителни среди (Бешков и др., 1986; Гущеров и др., 1977).

2. Тест-микроорганизми

2.1.

Грамположителни: *Staphylococcus aureus* MRSA; *Bacillus subtilis* ATCC 6633;

Bacillus cereus; *Micrococcus luteus* ATCC 10240; *Sarcina lutea*.

2.2. Грамотрицателни: *Escherichia coli* ATCC 8739; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Salmonella abony* NTCC 6017.

2.3. Едноклетъчни гъби: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763; *Candida albicans* ATCC 10231.

2.4. Плесенни гъби: *Aspergillus niger*; *Penicillium chrysogenum*.

3. Скрининг за антимицетна активност

Антимикробната активност на изолираните щамове е определена по метода на дифузия в агар чрез перпендикулярни шрихи (Гущеров и др., 1977).

4. Характеристика на актиномицетния изолат

4.1. Морфологична и културална характеристика

Морфологичните и културални свойства са проучвани по метода на разсяване на културата върху твърди хранителни среди: Гаузе I, Гаузе II, Красилников, Чапек, Царевична №б, СР - 1 с глюкоза, захарозна, скорбяло-амонячна (Бешков и др., 1986). Култивирането е проведено при 28°C в продължение на 21 дни. Изследва се растежа и пигментацията на въздушния и субстратния мицел, разтворим пигмент в хранителната среда, форма на спороносците и спорите (Гаузе и др., 1983; Гущеров и др., 1977).

4.2. Физиолого-биохимични изследвания

Изследванията по отношение на усвояване на различни въглеродни и азотни източници бяха проведени по метода на (Pridham and Gottlieb, 1948). За определяне на биохимичните свойства щамът бе изследван по отношение на ензимната му активност: протеолитична, амилолитична, целулазна, захарозна, каталазна, инвертазна, карболитична, редуцираща (Гаузе и др., 1983; Гущеров и др., 1977).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

От българска почва в района на гр. Разград са изолирани 18 актиномицетни щамове. При проведените скрининг се установи, че шест от тях (изолати: 11, СР 5, А 2, Г 15, Л-23 и ИС/1В) проявяват антагонистични свойства спрямо бактерии и/или гъби, но в различна степен. Резултатите са представени в таблица 1. Данните показват, че най-силно изразени антимикробни свойства и в най-широк спектър проявява изолат 11 и той е подложен на по-нататъшни изследвания. Поддържа се на хранителна среда Гаузе I.

Таблица 1

Антимикробна активност на актиномицетни изолати при първичен скрининг за антагонизъм

Тест-микроорганизми	Актиномицетни изолати					
	Стерилни зони, mm					
	11	СР 5	А 2	Г 15	Л-23	ИС/1В
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	19	0	0	0	5	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	23	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	20	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	0	0	0	0	0	0
<i>Sarcina lutea</i>	20	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	12	10	0	0	8	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella abony</i> NTCC 6017	0	0	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	30	15	20	0	33	12
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	18	0	0	15	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	24	0	0	0	0	11
<i>Penicillium chrysogenum</i>	22	0	0	0	0	0

Морфологичните и културални свойства на щам 11 са представени в таблица 2. На повечето среди щамът расте много добре, като образува от бял до сив въздушен мицел и от

безцветен до кафяв субстратен мицел (снимки 1, 2). Спороносците са дълги, прави и извити (снимка 3), спорите са продълговати. Щамът отделя разтворим пигмент в някои от хранителните среди. В резултат на тези изследвания актиномицетният изолат е отнесен към род *Streptomyces* (Гаузе и др., 1983; Buchanan and Gibbons, 1974).

Данните за физиолого-биохимичните свойства показват, че изследваният щам усвоява много добре въглеродните източници глюкоза, гапактоза, захароза и малтоза; добре - лактоза; слабо - арабиноза и сорбитол, а изобщо не усвоява ксилоза, манитол, инозитол, натриев цитрат (таблица 3). От данните, представени в таблица 4 се вижда, че щам *Streptomyces sp.* 11 усвоява азота от почти всички източници, с изключение на $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ и аспарагин.

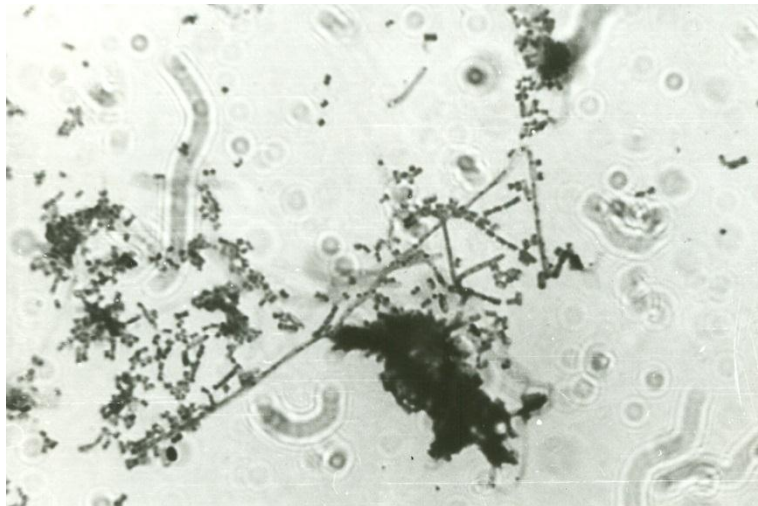
Щамът пептонизира без да коагулира млякото, разгражда нишестето и желатина. Расте слабо върху целулоза, проявява инвертазна активност, много слабо редуцира нитратите. Отделя сероводород, не образува индол. Щамът е каталазоположителен.



Сн. 1 Колонии на щам 11 на среда Гаузе I



Сн. 2 Колонии на щам 11 на среда CP-1 с глюкоза



Сн. 3 Спороносци и спори на щам 11 (1000 X).

Streptomyces sp. 11 расте при температура от 20 до 50°C (най-добре при 28°C), при рН от 5.0 – 9.0 и при концентрации на NaCl 1 -7 %.

В резултат от направените изследвания на морфологичните, културални, физиолого-биохимични свойства, тестваният щам *Streptomyces sp.* 11 е идентифициран като *Streptomyces griseoloalbus* (Гаузе и др., 1983; Buchanan and Gibbons, 1974), чиято характеристика е следната:

Върху минерална среда I.(Гаузе I) въздушен мицел жълтеникавобял, с течение на времето посивяващ, брашнест или като кадифе; субстратен мицел жълтеникав или сиво-кафеникавожълт; средата оцветява в жълтеникав, сивокафеникав или сиво-кафеникавожълт цвят; спороносци прави, спори овални и продълговати (1.3-1.5 X 1 μm и 2-2.2 X 0.9-1 μm). Върху органична среда II (Гаузе II) въздушен мицел белезникав, оскъден; субстратен мицел безцветен или жълтеникав; оцветява средата в жълт цвят.

Таблица 2

Културално морфологични признаци на актиномицетен щам 11

Хранителна среда	Интензивност на растежа	Пигментообразуване (оцветяване) на:			Спороносци
		Въздушен мицел	Субстратен мицел	Хранителна среда	
Гаузе I	Много добър	Бял до бежовосив	Сиво-кафеникав	Сивокафяв	Много дълги, прави и леко извити
Гаузе II	Много добър	Белезникавосив	Безцветен		Дълги, прави
Красилников	Среден	Бял	Безцветен		Къси, прави
Чапек	Не расте	-	-	-	-
Царевична №б	Много добър	Тъмносив	Бежов до кафяв		Дълги, прави
СР-1 с глюкоза	Много добър	Светлосив	Кремавосив	Жълт	Разклонени, извити
Захарозна	Добър	Белезникавосив	Безцветен		Дълги, прави и извити
Скорбяло-амонячна	Добър	Бял	Пясъчно-кафяв до кафяв		Дълги, прави и извити

Таблица 3

Усвояване на въглеродни източници от щам *Streptomyces sp.* 11

Източници на въглерод	Интензивност на растежа	Пигментообразуване (оцветяване) на:		
		Въздушен мицел	Субстратен мицел	Хранителна среда
Глюкоза	+++	Сивобял	Тъмнобежов	Жълт
Галактоза	+++	Сив	Кремав	Бледожълт
Ксилоза	-	-	-	-
Захароза	+++	Сив	Бежов	Лимоненожълт
Малтоза	+++	Сив	Сивобял	Жълт
Лактоза	++	Сивобял	Кремав	Жълт
Арабиноза	+	-	-	-
Манитол	-	-	-	-
Инозитол	-	-	-	-
Сорбитол	+	Бял	Бял	-
Натриев цитрат	-	-	-	-
Контрола	+	-	-	-

Легенда: - няма растеж; + слаб растеж; ++ добър растеж; +++ много добър растеж

Физиолого-биохимични свойства – коагулира и пептонира мляко, втечнява желатина, хидролизира скорбяла, инвертира захароза, слабо редуцира нитрати до нитрити, расте върху целулоза. Антагонистични свойства – подтиска растежа на *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium granulatum* и в по-малка степен *Candida albicans*. Рядко се среща в почвите.

Таблица 4

Усвояване на азотни източници от щам *Streptomyces sp.* 11

Азотен източник	Интензивност на растежа
NaNO ₂	+ +
Ca(NO ₃) ₂	+ +
(NH ₄)H ₂ PO ₄	-
KNO ₃	++
NH ₄ Cl	+
NH ₄ (SO ₄) ₂	++
Аспарагин	-
Контрола	+

Легенда: - няма растеж; + слаб растеж; ++ добър растеж

ИЗВОДИ

Резултатите от направените изследвания показваха, че по морфолого-културални и физиолого-биохимични признаци изследваният щам *Streptomyces sp.* 11 може да се отнесе към серия *Albosporeus* по Гаузе и е определен като *Streptomyces griseoloalbus*. Щамът проявява широк спектър на антимикробна активност срещу грамположителни и грамтрицателни бактерии и едноклетъчни и плесенни гъби и по-нататъшната работа трябва да бъде насочена към проучване на веществата с антимикробно действие и параметрите, които контролират процеса на техния биосинтез.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бешков, М. Н., Е. А. Карова, И. Мургов, 1986. Ръководство за упражнения по микробиология, Земиздат, София
2. Гаузе, Г. Ф., Т. П. Преображенская, М. А. Свешникова, А. П. Терехова, Т. С. Максимова, 1983. Определитель актиномицетов, Наука, Москва
3. Гущеров, Г., П. Андонов, Ц. Тодоров, Л. Коминков, М. Гинчева-Старчева, 1977. Практикум по микробиология с вирусология, Наука и изкуство, София
4. Anderson, A. S., E. M. H. Wellington, 2001. The Taxonomy of *Streptomyces* and Related Genera, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 3, 797-814
5. Buchanan, R. E., N. E. Gibbons, 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edition, The Williams & Wilkins Company, Baltimore
6. Bull, A. T., J. E. Stach, 2007. Marine Actinobacteria: New Opportunities for Natural Product Search and Discovery, *Trends in Microbiology*, 15, 491-499
7. Houssam, M. A., R. Bayoumi, M. El-Sehrawi, F. G. Gehan, 2011. Taxonomic Studies and Phylogenetic Characterization of *Streptomyces rimosus*-KH-1223-55 Isolated from Al-Khurmah Governorate, KSA, *Researcher*, 3, 9, 27-40
8. Pridham, T. G., D. Gottlieb, 1948. The Utilization of Carbon Compounds by Some Actinomycetes as an Aid for Species Determination, *Journal of Bacteriology*, 56, 1, 107-114