

УДК 579.873.71

**ХАРАКТЕРИСТИКА ОЗНАК СТІЙКОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ У  
ПРОДУЦЕНТІВ ПРОТИПУХЛИННИХ АНТИБІОТИКІВ STREPTOMYCES  
GLOBISPORUS 1912, STREPTOMYCES PEUCETIUS ATCC 29050 ТА  
STREPTOMYCES PEUCETIUS SUBSP. CAESIUS ATCC 27952**

**Л. Дубицька, С. Заворотна, Б. Остап, О.Громико, Л.Басілія, В.Федоренко**

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул.Грушевського 4, 79005 Львів, Україна  
email: [genetic@franko.lviv.ua](mailto:genetic@franko.lviv.ua)*

Серед антибіотиків актиноміцетного походження важливе місце посідають протипухлинні препарати. Висока вартість цих препаратів зумовлена порівняно низькою антибіотичною активністю штамів-продуцентів та їх здатністю синтезувати складні суміші кінцевих продуктів, з яких лише один або два мають терапевтичну цінність. Дослідженнями останніх років виявлено, що високий рівень продукції антибіотика зумовлений не тільки експресією генів біосинтезу, а й значно залежить від генів резистентності як до власного, так і до інших антибіотиків [3,10]. Тому інтенсивно вивчають генетичний контроль стійкості актиноміцетів до антибіотиків та використання цих ознак у селекції актиноміцетів - продуцентів промислово важливих антибіотиків.

Наша мета - вивчити штами актиноміцетів - продуцентів протипухлинних антибіотиків даунорубіцину *S.peucetius* ATCC 29050, доксорубіцину *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952 та ландоміцину *E S.globisporus* 1912 за ознаками антибіотикорезистентності.

Штам *S.globisporus* 1912 отримано від проф. Б.П. Мацелюха (ІМВ ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ), а штами *S.peucetius* ATCC 29050 та *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952 - з колекції культур РНЦА, Москва. Штам 1912 вирощували на сойовому середовищі, а штами 29050 та 27952 -на середовищах Чапека та ПКА-5 [1]. Визначення рівнів стійкості штамів до антибіотиків, виділення мутантів, резистентних до антибіотиків, індукцію стійкості *S.globisporus* 1912 до макролідів та лінкоміцину виконували за описаними методиками [2,11].

Ми виявили, що для досліджених штамів актиноміцетів характерна морфологічна нестабільність. Штам 1912 утворював два типи колоній - білі, споруючі (1912-1) та сірі, олігоспорові (1912-2). Штам 29050 утворював колонії двох типів: з сірим (29050-1) та білим (29050-2) забарвленням спор, а штам 27952 - трьох типів: з сірим (27952-1), білим (27952-2) та світло-сірим (27952-3). Визначено спектри та рівні стійкості зазначених морфологічних варіантів досліджуваних штамів до антибіотиків різного механізму дії (табл.1, 2). Одержані дані порівнювали зі спектрами резистентності 13 мутантів *S.globisporus* 1912-2, що не синтезують

Таблиця 1  
Спектр стійкості до антибіотиків штамів *S. globisporus* 1912, *S. peucetius* ATCC 29050 та *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952.

Антибіотик	Конц. мкг/ диск	<i>S. globisporus</i> 1912		<i>S. peucetius</i> 29050		<i>S. peucetius</i> subsp. <i>caesius</i> ATCC27952		
		1	2	2	1	2	1	3
Ериторміцин	15	9,0±0,0	16,0±1,0	8,7±0,3	13,0±1,5	27,5±6,5	37,7±3,7	30,3±4,7
Олеандоміцин	15	15,0±1, 5	17,7±2,0	9,7±0,3	12,0±1,2	33,0±2,0	38,7±3,7	34,7±2,4
Лінкоміцин	15	11,3±1, 9	13,0±0,0	20,7±4,1	27,7±0,3	16,5±1,5	17,5±7,5	16,7±1,7
Стрептоміцин	30	36,7±2, 7	33,7±9,8	25,0±2,9	36,0±2,1	28,0±7,0	31,3±4,3	29,7±4,2
Мономіцин	30	23,5±1, 0	27,7±6,3	21,3±3,8	29,7±4,5	25,5±7,5	25,6±6,2	26,7±4,7
Канаміцин	30	23,7±0, 2	33,7±7,3	24,3±4,8	27,3±0,6	20,0±1,0	26,3±3,9	23,7±1,6
Гентаміцин	10	18,5±2, 0	26,0±4,6	19,0±2,7	20,0±0,0	18,5±4,5	15,5±0,5	18,3±2,9
Тетрациклін	30	31,3±0, 7	13,3±0,9	20,3±3,2	20,3±4,3	32,5±9,5	30,0±2,9	32,0±4,2
Рифампіцин	5	18,2±0, 7	28,0±0,6	0	0	34,5±0,5	43,0±1,0	39,7±0,9
Хлорамфенікол	30	20,0±0, 6	14,3±0,7	23,7±0,7	25,3±1,5	18,0±0,0	23,3±1,5	25,3±3,4
Ампіцилін	10	0	0	0	0	0	0	0
Карбеніцилін	25	0	0	0	0	11,0±1,0	7,3±4,1	0
Оксацилін	10	0	0	0	0	0	0	0
Бензилпеніцилін	10	0	0	0	0	0	0	0
Цефалотин	15	0	0	0	0	0	0	0
Поліміксин М	30	8,6±0,4	10,0±1,2	9,3±0,3	10,0±0,6	9,0±1,0	9,0±0,6	9,7±0,7
Ристаміцин	30	23,5±0,3	28,0±1,0	24,0±0,6	28,3±1,2	23,5±1,5	30,7±0,7	27,3±3,5

Таблиця 2

Вживання спор *Streptomyces globisporus* 1912-2 на мінімальному середовищі з додаванням різних антибіотиків

Антибіотики	Концентрація антибіотика, що дає відсоток виживання спор, мкг/мл	
	50 - 100%	≈ 1%
Еритроміцин	1,0 - 5,0	10,0 - 15,0
Олеандоміцин	< 2,0	15,0
Лінкоміцин	< 2,0	10,0
Ріфампіцин	<0,1	1,0
Хлорамфенікол	1,0 - 5,0	10,0
Даунорубіцин	0,1	0,5
Доксорубіцин	0,1	1,0
Дактиноміцин	0,1 - 0,2	0,5
Тетрациклін	1,0 - 5,0	30,0
Стрептоміцин	<< 0,1	< 0,1
Канаміцин	0,1 - 0,2	0,5
Апраміцин	< 0,1	< 1
Налідиксова кислота	≈ 500 ( на соєвому середовищі)	-

ландоміцину E, та 11 мутантів з підвищеним біосинтезом цього антибіотика. Виявлено певні особливості спектра резистентності, характерні для всіх досліджених штамів *S.globisporus*. Вони стійкі до β-лактамів, поліміксину, помірно чутливі до тетрацикліну, хлорамфеніколу макролідів і лінкоміцину (перша група антибіотиків) та високочутливі до антрациклінів, актиноміцину D, ріфампіцину й амноглікозидів (друга група антибіотиків). Наприклад, високий рівень виживання спор (від 50 до 100 %) простежували при вмісті в середовищі від 1 до 5 мкг/мл антибіотиків першої групи і менше 0,2 мкг/мл антибіотиків другої групи. Порівнюючи штами 1912-1 та 1912-2, виявили, що між ними є певні відмінності за рівнем стійкості до деяких антибіотиків. Наприклад, штам 1912-1 резистентніший, ніж штам 1912-2, до ріфампіцину (див.табл.1). Однак штам 1912-2, для якого характерна вища антибіотична активність, є стійкішим, ніж 1912-1, до деяких полікетидів (наприклад, еритроміцину) і, зокрема, антрациклінів - даунорубіцину та доксорубіцину (рис.1). Особливо суттєвою є відмінність у виживанні штамів 1912-1 та 1912-2 на

середовищах з 0,5 - 5,0 мкг/мл доксорубіцину ( $10^3$  -  $10^4$  разів). Однак ці штами не відрізнялися за чутливістю до низьких

концентрацій (0,1-1,0 мкг/мл) іншого протипухлинного антибіотика - актиноміцину D. До більш високих концентрацій цього антибіотика резистентніший є штамп 1912-1 (див. рис.1). Не виявлено суттєвих відмінностей у спектрах резистентності до 16 використаних антибіотиків (до яких не належать протипухлинні) між вихідним штамом 1912-2 та його мутантами, що не утворюють ландоміцину E, і похідними цього ж штаму з підвищеною здатністю до синтезу цього антибіотика.

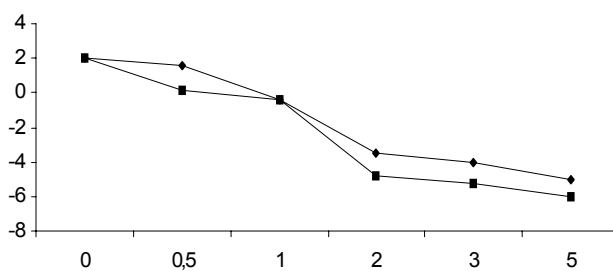
Як видно з табл.1, морфологічні типи штамів 29050 та 27952 мають подібні спектри стійкості до використаних антибіотиків. Є лише декілька відмінностей за дослідженими ознаками: 29050-1 помітно резистентніший від 29050-2 до стрептоміцину та мономіцину, а 27952-1 стійкіший від 27952-2 до макролідів і рифампіцину. Порівнявши штами 1912, 29050 та 27952 ми виявили, що за спектрами стійкості до антибіотиків вони подібні, однак продуцент доксорубіцину (27952) чутливіший, ніж продуценти даунорубіцину (29050) та ландоміцину E (1912), до рифампіцину, макролідів і тетрацикліну (див.табл.1). На підставі аналізу стійкості досліджуваних штамів до протипухлинних антибіотиків (рис.1-3) виявили, що всі вони найстійкіші до актиноміцину D. Якщо актиноміцин D повністю пригнічує ріст штамів лише при концентрації в середовищі 200 мкг/мл, то даунорубіцин та доксорубіцин - при 30 - 50мкг/мл.

Цікавим є питання про рівні стійкості штамів *S.reusetius* до власних антибіотиків - даунорубіцину та доксорубіцину, які є продуктами одного шляху біосинтезу та дуже подібні за будовою [4]. Всі морфологічні варіанти штамів *S.reusetius* мають вищий рівень стійкості до власного антибіотика (штам 29050 - до даунорубіцину, а 27952 - до доксорубіцину), ніж до іншого спорідненого антрацикліну (рис.2 і 3). Це, очевидно, пояснюється одночасним функціонуванням декількох механізмів стійкості до власного антибіотика, як характерно для багатьох інших актиноміцетів [4, 5, 8].

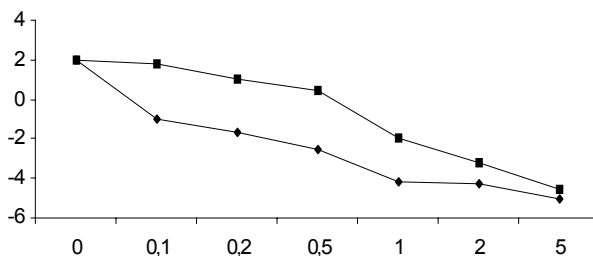
У табл.3 наведені дані про частоти виникнення спонтанних та індукованих ультрафіолетовим опроміненням мутантів *S.globisporus* 1912 з підвищеною стійкістю до антибіотиків. Зазначимо, що спонтанні доксорубіцин- і даунорубіцин-резистентні мутанти були нестабільними та розщеплювались у наступних генераціях.

Стійкість *S.globisporus* 1912 до макролідів та лінкоміцину відповідає рівням природної резистентності до MLS-антибіотиків (макролідів, лінкозамідів і стрептограмінів групи B) ряду інших актиноміцетів [2, 5]. Про наявність генетичних детермінантів MLS-стійкості у *S.globisporus* 1912 свідчить також виникнення мутантів, що одночасно стійкі до декількох макролідів та лінкоміцину. Мутанти *ermR50* та *ermR100*, виділені як стійкі до еритроміцину в концентраціях відповідно 50 та 100 мкг/мл, виявили підвищену резистентність також і до олеандоміцину, тилозину та лінкоміцину. В концентрації 30 мкг/мл ці антибіотики летальні для вихідного штаму *S.globisporus* 1912, тоді як виживання спор мутанта на середовищах з таким же вмістом цих антибіотиків коливалося від 1,7 до 23,0%. Експресія генів

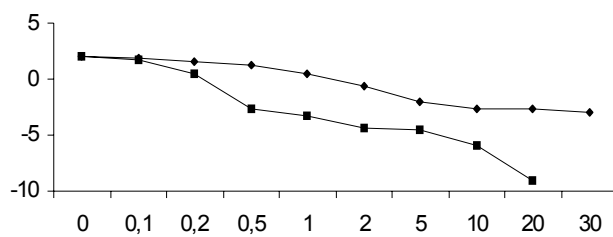
A



B



C



О.Цвілинюк, О.Терек, Н.Романюк

Рис.1 Залежність виживання спор штамів *S. globisporus* від концентрації антибіотика в середовищі. 1 - штам 1912-1; 2 - штам 1912-2; а - середовище з АСТ D; б - з DNR; в - з DXR.

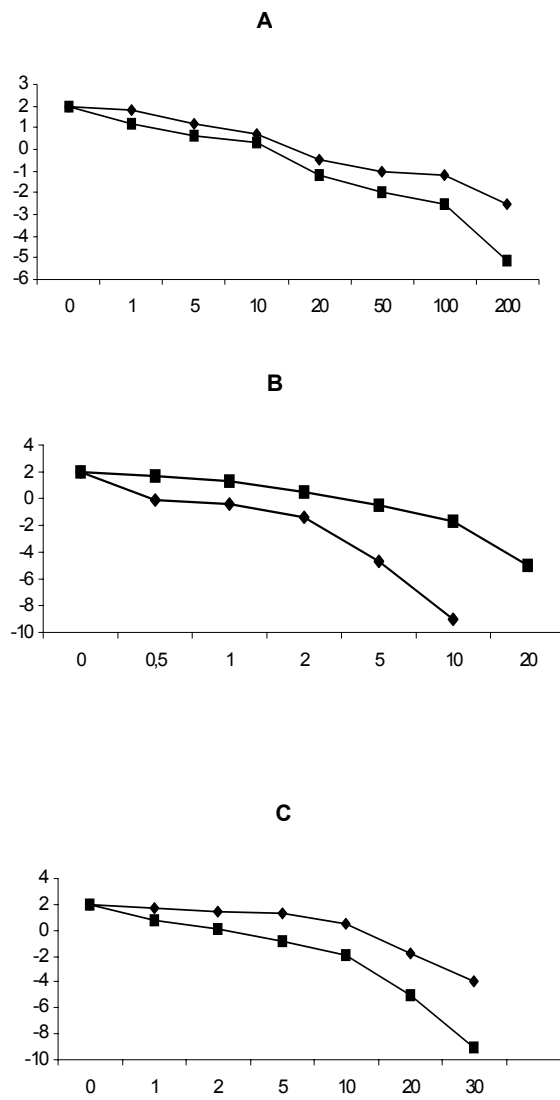


Рис. 2 Залежність виживання спор штамів *S. reusetius* 29050 від концентрації антибіотиків в середовищі. 1- штам 29050-1, 2 - штам 29050 - 2; а - середовище з АСТ D; б - з DNR; в - з DXR.

MLS - стійкості у багатьох актиноміцетів може індукуватися попередньою короткотривалою інкубацією спор штамів у присутності субінгібуючих концентрацій антибіотиків[2,9]. Ми досліджували, чи MLS-стійкість вихідного штаму 1912- 2 та його мутанта egmR100 індукується. Як потенційні індуктори використовували тилозин, олеандоміцин, еритроміцин і лінкоміцин. Вивчали також, чи впливають на індукцію такі фактори, як вік культур (24 або 48 год), час інкубації спор з індуктором (10-60 хв), концентрація індуктора (0,1-1,2 мкг/мл) (рис.4). З рис.4 бачимо, що для однодобової культури вихідного штаму 1912-2 найліпшим індуктором MLS-стійкості є еритроміцин. Його оптимальною концентрацією для індукції є 0,1 мкг/мл з часом

Таблиця 3

Мутанти *Streptomyces globisporus* 1912, стійкі до антибіотиків.

Антибіотики	Рівень стійкості (концентрація антибіотика в МС, мкг/мл)	Спонтанні чи індуковані	Частоти
Даунорубіцин	5	Спонтанні*	$0.4 \times 10^{-6}$
Доксорубіцин	20	Спонтанні*	$6.0 \times 10^{-5}$
	30	Спонтанні*	$5.3 \times 10^{-6}$
Дактиноміцин	2	Спонтанні	$1.6 \times 10^{-7}$
	2	УФ	$2.0 \times 10^{-6}$
	5	Спонтанні	$1.1 \times 10^{-8}$
	5	УФ	$0.9 \times 10^{-7}$
Еритроміцин	50	УФ	$3.6 \times 10^{-6}$

Тетрациклін	50	УФ	$3.0 \times 10^{-6}$
Ріфампіцин	10	Спонтанні	$7.0 \times 10^{-6}$
Хлорамфенікол	30	Спонтанні	$1.5 \times 10^{-7}$
Стрептоміцин	2	Спонтанні	$1.0 \times 10^{-8}$
Ландоміцин Е	20мкл сирцю/ МС 10 мл	Спонтанні	$2.0 \times 10^{-6}$

інкубації 20 хв. Індукцію стійкості в описаних вище умовах для дводобової культури 1912-2 не простежували. Це свідчить про те, що індукція MLS-стійкості під впливом зовнішнього індуктора відбувається лише в певний, обмежений у часі період розвитку культури, що спостерігали і в інших бактерій [2, 6, 7, 11]. Цікаво, що екзогенний еритроміцин в умовах, оптимальних для вихідного штаму 1912-2, не спричиняв індукції стійкості до еритроміцину у мутанта *ermR100*. Це дає змогу стверджувати, що MLS-стійкість цього мутанта, на відміну від вихідного штаму, є

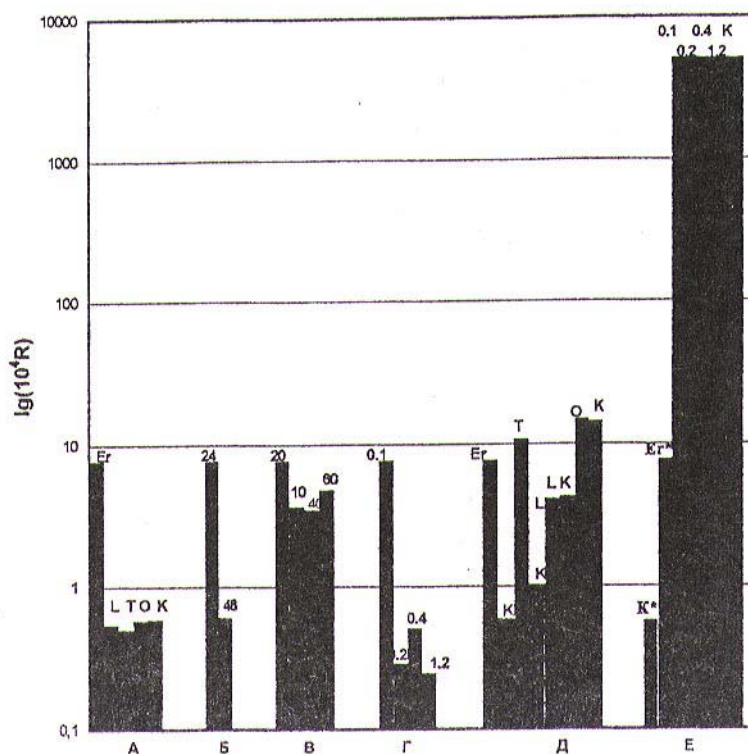


Рис.4. Рівень індукції стійкості R до MLS-антибіотиків у *Streptomyces globisporus* 1912 та його еритроміцинстійкого мутанта *S. globisporus* E100 залежно від: А - природи індуктора; Б - віку культури (год); В - часу інкубації з індуктором (хв); Г - концентрації індуктора (мкг/ мл суспензії клітин певної оптичної густини); Д - природи антибіотика, стійкість до якого індукується; Е - штаму, в якому проводили індукцію (К\*,Er\* - штам дикого типу; решта - штам *S. globisporus* E100 - відсутність індукції).

Er - еритроміцин, L - лінкоміцин, T - тилозин, O - олеандоміцин, K - контроль (висів на селективні середовища без попередньої індукції стійкості). У кожній з шести серій експериментів вивчали вплив одного з шести факторів на рівень індукції стійкості в *S. globisporus* sp. У кожному досліді решта п'ять параметрів були стандартними та оптимальними для індукції стійкості, а саме: А - еритроміцин; Б - 24-годинна культура; В - 20 хв.; Г - 0.1 мкг/мл; Д - еритроміцин; Е - *Streptomyces globisporus* 1912 (дикий тип).

конститутивною. Подібні конститутивні мутанти описані і в інших актиномицетів. Мутації конститутивності локалізовані переважно в промоторно-операторних районах генів метилаз 23SpPHK, які зумовлюють стійкість клітин до MLS-антибіотиків [6, 7]. Імовірно, що такі мутанти матимуть вищий, ніж у вихідного штаму, рівень стійкості до макролідів і можуть найперше відбиратися під час пошуку еритроміцин-стійких мутантів.

Отримані дані мають важливе значення для подальшої генетико-селекційної роботи з дослідженими продуцентами протипухлинних антибіотиків, зокрема, у використанні детермінантів антибіотикорезистентності для конструювання, відбору, підтримання стабільності високоактивних продуцентів та їхнього генетичного аналізу.

Ця робота частково підтримана грантами INTAS - Україна 95-0020 та BMBF0311308.

1. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А. и др. Определитель актиномицетов. М., 1983.
2. Чиненова Т. А., Бирюкова Н.В. Детерминанты устойчивости к хлортетрациклину и другим антибиотикам у штамма *Streptomyces aureofaciens* - продуцента хлортетрациклина // Генетика. 1990. Т.26. С.52-60.
3. Cramer R., Devies J.E. Increased production of aminoglycosides associated with amplified antibiotic resistance genes // J. Antibiot. 1986. Vol.39. P. 128-135.
4. Hutchinson C.R. Biosynthetic studies of daunorubicin and tetracenomycinC // Chem.Rev. 1997. Vol.97. P.2525-2535.

5. Kelemen G.H., Zalacain M., Seno E., Cundliffe E. Transcriptional attenuation control of the tylosin-resistance gene *tlrA* in *Streptomyces fradiae* // *Mol.Microbiol.* 1994. Vol.14. P.833-842.
6. Lovett P.S. Ribosome regulation by nascent peptides // *Microbiol.Rev.* 1996. Vol.60. P.366- 385.
7. Mayford M. and Weisblum B. The *ermC* leader peptide alterations leading to differential efficiency of induction by MLS-antibiotics // *J.Bacteriol.* 1990. Vol.172. P.3772-3779.
8. Moreno -Fernandez M.A., J Salas, K. F., Chater et al. The act-cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *blt*-tRNA gene of *Streptomyces* // *Cell.* 1991. Vol.66. P.769-780.
9. Salah-Bey K., Blanc V., Thompson C. J. Stress-activated expression of a *Streptomyces pristinaespiralis* multidrug resistance gene(*ptr*) in various *Streptomyces* spp. and *E.coli* // *Mol.Microbiol.* 1995. Vol.17. P.1001-1012.
10. Vining L.C.Global regulation of secondary metabolism // *Proc. of the 9<sup>th</sup> symp. on actinomycetes.* 1995. P.184-188.
11. Weisblum B. Inducible resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin typeB antibiotics: the resistance phenotype, it's biological diversity and structural elements that regulate expression // *Gene function in procaryotes.* CSH Lab. 1983. P.91-121.

**CHARACTERIZATION OF RESISTANCE PATTERN TO ANTIBIOTICS OF  
PRODUCERS OF ANTITUMOUR ANTIBIOTICS *STREPTOMYCES*  
*GLOBISPORUS 1912, STREPTOMYCES PEUCETIUS ATCC 29050 AND*  
*STREPTOMYCES PEUCETIUS SUBSP. CAESIUS ATCC 27952***

**L. Dubytska, S. Zavorotna, B. Ostash, O. Gromyko, L. Basiliya, V. Fedorenko**

*Ivan Franko National University of Lviv, Hrushevskyyi st.4,  
UA-79005 Lviv, Ukraine, e-mail: genetic@franko.lviv.ua*

Antibiotic resistance pattern has been studied in strains *S. globisporus* 1912 and *S. peucetius* ATCC 29050 and ATCC 27925. 50-100% *S. globisporus* spore survival was observed when medium contained 1-5 µg/ml of β-lactams, macrolides, tetracycline. The same level of spore survival, when using aminoglycosides, anthracyclines, rifampicin was indicated at more decreased concentrations ( less than 0.2µg/ml). Strain 1912-2, which has enhanced productivity, is more resistant to anthracyclines. Strains 1912, 29050, 27925 have similar antibiotic resistance spectra. *Ery<sup>r</sup>* - mutants of *S. globisporus* appear to be resistant simultaneously to so called MLS-antibiotics. Resistance to MLS-antibiotics is induced in wild type and optimal conditions for induction were determined. Induction of resistance in *Ery<sup>r</sup>* mutants were not observed.

*Key words:* *Streptomyces*, antibiotics, resistance to antibiotics.

О.Цвілинюк, О.Терек, Н.Романюк

Стаття надійшла до редколегії 02.09.1999  
Прийнята до друку 7.07.2000