

УДК 567.809.55

ГЕНЕТИЧНА НЕСТАБІЛЬНІСТЬ СТІЙКОСТІ *STREPTOMYCES AMBOFACIENS* ДО ХЛОРАМФЕНІКОЛУ

В.Федоренко

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул.Грушевського, 4, м.Львів, 79005 Україна
e-mail: genetic@franko.lviv.ua

Культура *Streptomyces ambofaciens* утворює макролідний антибіотик спіраміцин, який містить 16-членне макролідне кільце та залишки цукрів форозаміну, мікарози та мікамінози. Його використовується в медицині та ветеринарії для лікування інфекцій, спричинених грам-позитивними бактеріями та мікоплазмами, а також у вигляді кормової домішки для сільськогосподарських тварин [11]. Сьогодні отримано дані про механізм біосинтезу спіраміцину, ідентифіковано та клоновано ряд генів, що контролюють утворення цього антибіотика культурою *S.ambofaciens* [12]. Однак продуцент спіраміцину недостатньо вивчений генетично. Зокрема, не вивчена експресія ознак резистентності культури до інших, відмінних від макролідів, антибіотиків, генетична нестабільність резистентності до антибіотиків, не визначені кореляції між варіабельністю морфологічних ознак, стійкості до антибіотиків та здатності до біосинтезу спіраміцину. Для ряду штамів - продуцентів спіраміцину описана морфологічна гіперваріабельність, яка виявляється у втраті з високою частотою (близько 90%) здатності колоній утворювати спори та пігмент. У деяких випадках це явище корелює з втратою антибіотичної активності і перебудовами в хромосомах *S.ambofaciens* [7, 9]. Очевидно, що вивчення механізмів нестабільності морфологічних ознак продуцента спіраміцину і пошук способів стабілізації штамів за цими ознаками, експресія яких тісно пов'язана з вторинним метаболізмом, є важливим елементом генетичного конструювання і селекції *S.ambofaciens*. Нашою метою було вивчення генетичної нестабільності продуцента спіраміцину *S.ambofaciens* за ознакою стійкості до хлорамфеніколу та зв'язку цього явища з морфологічною варіабельністю й антибіотичною активністю цієї культури.

Ми використовували штами-продуценти спіраміцину *S.ambofaciens* ВНИИА 1115 (АТСС 23877) і ВНИИА 792 (АТСС 15154). Ці штами отримані з колекції РНЦА (Москва). Для визначення антибіотичної активності застосовано тест-культуру *Bacillus mycoides* НВ2. Культури актиноміцетів вирощували на вівсяному середовищі (ВС) [1]. У досліді з вирощування біомаси *S.ambofaciens* для виділення сумарної ДНК використовували середовище SGGP [8]. Методи визначення стійкості досліджуваних штамів до антибіотиків, антибіотичної активності, отримання мутантів, стійких до антибіотиків, виділення і рестрикційного аналізу сумарної ДНК описані раніше [4]. Статистичне опрацювання результатів визначення антибіотичної активності клонів *S.ambofaciens* виконували за методикою [2].

Вивчено також варіабельність морфології колоній, які утворюють штами *S.ambofaciens* 1115 та 792 на ВС. Виявлено, що вихідні культури цих штамів утворюють чотири типи колоній, відмінних за морфологією. Серед них лише 57,4% колоній штаму 972 та 69,2% колоній штаму 1115 за морфологією відповідали типовим сірим споруючим колоніям, описаним для *S.ambofaciens* на ВС [1]. Інші типи такі: сірі споруючі колонії з непігментованими (білими, Pig⁻) сосочками (17,1% у штаму 792 та 9,1% у штаму 1115); сірі колонії, які мають сектори з непігментованим міцелієм (21,9 та 15,4%); білі колонії без повітряного міцелію (Amy⁻ Pig⁻, 3,6 та 6,3%). Зазначимо, що частка клонів з нетиповою морфологією у досліджених нами штамів значно вища, ніж у іншого штаму *S.ambofaciens* DSM40697 (16,6%), дослідженого Леблондом та співавторами [9]. Саме ці клони, як досліджено в [9], є джерелом гіперваріабельних культур з порушеним біосинтезом спіраміцину.

Отже, різні штами, які не проходили добору на стабільність морфологічних ознак, можуть суттєво відрізнятися за частотою утворення спонтанних морфологічних варіантів. Оскільки морфологічна варіабельність і нестабільність продукції спіраміцину у *S.ambofaciens* корелюють [9], то важливе значення має пошук підходів до стабілізації морфологічних ознак цієї культури. Відомо, що одним з таких підходів може бути відбір культур актиноміцетів на середовищах з антибіотиками [3].

Ми досліджували співвідношення морфологічних варіантів серед колоній, які утворилися у процесі вирощування *S.ambofaciens* на середовищах з різними концентраціями хлорамфеніколу (СМ). Виявлено, що висів штаму 792 на середовища, що містять СМ у концентраціях 5 та 20 мкг/мл (виживання спор, відповідно, 100 і 1%), приводив до утворення 81,2 та 80,8% типових сірих колоній і зниження частки інших типів колоній. Однак на середовищі з 20 мкг/мл СМ частка Amy⁻-колоній зростає до 15,6%. З'ясовано, що Pig⁺- та Pig⁻-клони *S.ambofaciens* відрізняються за чутливістю до СМ. Якщо ці штами висівати за допомогою методу відбитків, то Pig⁺-штами не ростуть при 25 мкг/мл, а Pig⁻-штами - при 15 мкг/мл антибіотика у ВС. Ця різниця може бути тим чинником, що визначає нагромадження Pig⁺-клонів у процесі вирощування *S.ambofaciens* на середовищах із СМ.

Як бачимо, наявність СМ у поживному середовищі суттєво впливає на перерозподіл морфологічних типів колоній *S.ambofaciens*. Додавання цього антибіотика в концентраціях, що не спричиняють значного сповільнення росту, можна використовувати для отримання культур, у яких переважають Amy⁺Pig⁺-клони, що мають найвищу антибіотичну активність.

Наявність у колекції штамів *S.ambofaciens* з різним рівнем резистентності до СМ може свідчити про генетичну нестабільність цієї ознаки. Тому ми визначали, з якою частотою утворюються спонтанні мутанти штаму 1115 як чутливі до СМ (C1m^s), так і стійкі до вищих концентрацій цього антибіотика (C1m^r). При аналізі 1500 клонів штаму 1115 виявлено, що він утворює похідні, чутливі до 10 мкг/мл СМ з частотою $8,5 \times 10^{-3}$. Тоді як у штаму 1115 з частотою близько 10^{-5} виникають мутанти, стійкі до 50 мкг/мл СМ. Шляхом ступінчастого відбору на середовищах зі зростаючою концентрацією СМ отримано більш резистентні мутанти. Вивчивши 30 незалежних C1m^r-мутантів, стійких до 50 мкг/мл СМ, ми з'ясували, що вони утворюють похідні, стійкі до 70 мкг/мл антибіотика. Ці похідні утворюють з частотою $2,9 \times 10^{-2}$ мутанти, резистентні до 100 мкг/мл СМ.

Наведені результати дають змогу зробити висновок про нестабільність генетичного детермінанта, який визначає Cml^r та Cml^s-фенотипи *S.ambofaciens*. Ця нестабільність за фенотиповим проявом подібна до описаної раніше нестабільності cmlR-детермінантів *S.coelicolor* A3(2), *S.lividans* та *Sacch.erythraea* [3,4].

Спектри резистентності до 16 антибіотиків трьох Cml^s-мутантів (cmlS1, cmlS2, cmlS3) визначали за допомогою методу дифузії в агар. Їхні спектри подібні (табл. 1). Як і вихідний штам 1115, ці мутанти стійкі до β-лактамних антибіотиків та рифампіцину, помірно чутливі до тетрацикліну та поліміксину і високочутливі до

Таблиця 1
Спектр стійкості *S.ambofaciens* 1115 та його Cml^r-мутантів до антибіотиків

Антибіотик	Конц., мкг/мл	Діаметр зони пригнічення росту штамів, мм			
		1115	CmlS1	CmlS2	CmlS3
Олеандоміцин	100	0	16,1±2,1	16,3±1,8	13,7±0,8
Еритроміцин	100	0	11,5±0,9	14,3±0,7	15,0±1,1
Лінкоміцин	100	0	13,7±1,1	16,2±0,6	10,2±0,5
Хлорамфенікол	30	13,4±0,7	15,4±1,3	15,6±0,8	14,3±0,6
Стрептоміцин	30	30,6±2,4	27,6±1,8	26,7±2,4	26,4±1,5
Мономіцин	30	25,3±2,2	26,8±1,8	25,8±1,3	23,6±1,5
Гентаміцин	10	26,1±1,7	25,6± 2,3	21,8±1,5	24,9±0,9
Канаміцин	30	34,3± 2,0	31,8±0,9	31,7±1,2	32,2±2,0
Тетрациклін	30	8,1±0,6	8,3±0,4	8,3±0,3	8,1±0,3
Пеніцилін	10	0	0	0	0
Ампіцилін	10	0	0	0	0
Карбеніцилін	25	0	0	0	0
Оксацилін	10	0	0	0	0
Рифампіцин	100	0	0	0	0
Ристоміцин	30	24,5±1,4	25,4±2,1	25,7 ±1,7	23,4±1,5
Поліміксин	300	11,2± 0,5	10,3±0,6	10,1±1,2	11,5±1,3

аміноглікозидів та ристоміцину. Однак, на відміну від штаму 1115, вони виявляють чутливість до макролідів (олеандоміцину та еритроміцину) та лінкоміцину (MLS^s-фенотип). Ці дані підтверджено у процесі титрування спор мутанта cmlS2 на середовищах зі зростаючими концентраціями еритроміцину та лінкоміцину (рис.1). На середовищі з 100 мкг/мл цього антибіотика виживання спор штаму 1115 становило 75,7%, а мутанта cmlS2 - лише 0,01%. Виявлено також, що мутант CmlR11, резистентний до підвищених концентрацій CM, є одночасно стійкішим від вихідного штаму до еритроміцину та лінкоміцину (див. рис.1). Отримані дані свідчать про пряму кореляцію між фенотипами Cml^r/Cml^s та MLS^r/MLS^s *S.ambofaciens*. З літератури відомо, що MLS-антибіотики та CM здатні

конкурувати за сайти зв'язування на 50S-субодиниці рибосоми і деякі мутації можуть спричинити одночасні зміни стійкості бактерій до цих антибіотиків[5].

Крім того, ми визначали антибіотичну активність 145 спонтанних клонів вихідного штаму *S.ambofaciens* 1115, 134 клонів цього штаму, оброблених метилнітросесечовиною (МНС), а також 119, 97 та 123 клонів Cm^r -мутантів *cmlR30*, *cmlR45* і *cmlR11*, відповідно. Клонам штаму 1115 властива висока варіабельність рівня антибіотичної активності (коефіцієнт варіації $CV=45\%$). У великій частини клонів (2,76%) не виявлено антибіотичної активності (Spr^+ -фенотип) і лише один клон (0,69%) належав до класу "плюс"-варіантів з рівнем активності понад $X+2\sigma$. Обробка МНС спричиняла значне підвищення мінливості за рівнем антибіотичної активності ($CV=89,8\%$). У цьому разі значно зросла частка Spr^+ -клонів і клонів, що утворюють антибіотик у слідових кількостях (близько 45,5%), тоді як частка найбільш цінних селекційно "плюс"-варіантів" лише до 2,99%. Варіабельність антибіотичної активності серед окремих клонів Cm^r -мутантів нижча ($CV = 26,5, 28,1$ та $38,2$, відповідно, для мутантів *cmlR30*, *cmlR45* і *cmlR11*). Усі три

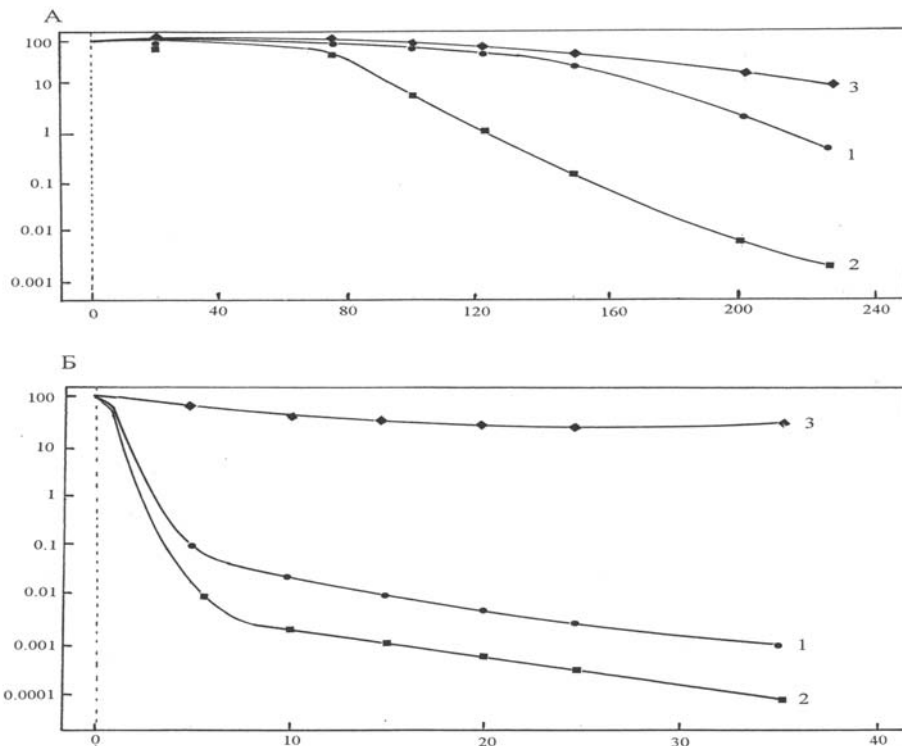


Рис.1. Залежність виживання спор штаму *S.ambofaciens* 1115 та його мутантів *cmlS2* і *cmlR11* від концентрації еритроміцину та лінкоміцину в середовищі. По осі абсцис - концентрація антибіотиків еритроміцину (а) та лінкоміцину (б), мкг/мл; по осі ординат - виживання спор (%); 1 - штаму 1115, 2 - *cmlS2*; 3 - *cmlR11*.

мутанти не утворюють Spr^I -клонів та клонів з найнижчим рівнем антибіотичної активності (до $X-2\sigma$). "Плюс"-варіанти серед клонів мутанта *cmlR30* не виявлені, тоді як серед клонів мутантів *cmlR* і *cmlR* вони становили відповідно 2,1 та 3,5% . Ці дані свідчать про певну стабілізацію рівня антибіотичної активності у Cml^F -мутантів і перспективність їх використання в селекції *S.ambofaciens*.

Генетична нестабільність ознак у актиноміцетів часто супроводжується перебудовами нуклеотидних послідовностей ДНК. Такі перебудови раніше ідентифіковані в ДНК мутантів *S.ambofaciens* з порушеною пігментацією (Pig^+) [6]. Однак ці автори не досліджували нуклеотидних перебудов у мутантів цього штаму зі зміненою стійкістю до антибіотиків.

Рис.2. Електрофореграма фрагментів сумарної ДНК штамів *S.ambofaciens*, отриманих після розщеплення ендонуклеазою рестрикції *VamHI*. 1 - $PstI$ -фрагменти ДНК фага λ ; 2 - *eryR60*; 3 - *cmlS2*; 4 - 1115; 5 - 792; 6 - *eryR5*; 7 - *strR1*; 8 - *cmlR45*.

Ми провели електрофоретичний аналіз *VamHI*-фрагментів сумарної ДНК вихідного штаму 1115 і його двох мутантів: *cmlS2* (Cml^S) і *cmlR45* (Cml^F). Для порівняння виконано аналогічний аналіз *VamHI*-фрагментів ДНК еритроміцин-стійкого мутанта штаму 1115-*ermR5*, а також штаму 792 та його двох мутантів - стійкого до еритроміцину (*ermR60*) і стійкого до стрептоміцину (*strR1*)-, отриманих у праці [10]. На рис.2 зображена картина електрофоретичного розподілу *VamHI*-фрагментів ДНК зазначених штамів. Виявлено, що ДНК вихідних штамів 792 та 1115 відрізняються за картиною розподілу *VamHI*-фрагментів; ДНК штаму 792, на відміну від штаму 1115, містить ампліфікації фрагментів розміром 20,0, 11,0, 10,0, 8,0, 5,3, 3,0 та 2,8 т.п.н. Зазначимо, що інші автори не виявляли ампліфікацій нуклеотидних послідовностей в ДНК *S.ambofaciens* дикого типу [5,9]. У геномі мутанта *ermR5* виявлено ампліфікацію фрагмента ДНК розміром 25 т.п.н. Суттєві відмінності порівняно з вихідним штамом 792 виявлені у його мутанта *ermR60* (додаткова ампліфікація фрагмента - 25 т.п.н, деампліфікація фрагментів - 3,0, 2,8 та 11,0 т.п.н.).

Подібну картину спостерігали і в процесі аналізу ДНК мутанта *strR1*. Такі перебудови ДНК *S.ambofaciens* раніше не описані в літературі.

Отже, отримані дані свідчать про порівняно високу частоту перебудов нуклеотидних послідовностей у геномі *S.ambofaciens*. Ці дані, однак, не дають змоги визначити прямі кореляції між наявністю виявлених нами перебудов ДНК і нестабільністю ознак стійкості до антибіотиків. Очевидною є також доцільність рестрикційного аналізу сумарної ДНК різних штамів *S.ambofaciens* з метою відбору найбільш стабільних варіантів культури.

1. Гаузе Г.Ф., Прображенская Т.П., Свешикова М.А. и др. Определитель актиномицетов. М., 1983.
2. Жукова Р.А., Коммунарская А.Д., Пронина М.И. и др. Методы селекции продуцентов антибиотиков и ферментов.Л., 1978.
3. Настасяк И.Н. Получение и характеристика мутаций у *Saccharopolyspora erythraea*, влияющих на биосинтез антибиотика эритромицина. Автореф дисс... канд.биол.наук. М., 1992.
4. Федоренко В.А., Стародубцева Л.И., Заворотная С.А. и др. Характеристика множественного изменения признаков устойчивости к антибиотикам у *Streptomyces coelicolor* A3(2)// Генетика.1989. Т.25. С.626-634.
5. Cundliffe E. On the nature of antibiotic binding site in ribosomes// Biochemie. 1987. Vol.69. P.863 - 869.
6. Demuyter P., Leblond P., Decaris B., Simonet J.-M. Characterisation of two families of spontaneously amplifiable units of DNA in *Streptomyces ambofaciens*// J. Gen. Microbiol. 1988. Vol.134.P.2001 - 2007.
7. Demuyter P., Schneider D., Leblond P., et al. A chromosomal hotspot for multiple rearrangements associated with genetic instability of *Streptomyces ambofaciens* DSM 40697 // J.Gen. Microbiol.1991.Vol.137.P.491-499.
8. Yamamoto H., Maurer K.H., Hutchinson C.R. Transformation of *Streptomyces erythraeus*// J.Antibiot.1983. Vol.36.P.283-288.
9. Leblond P., Demuyter P., Moutier L. et al. J.- M. Hypervariability, a new phenomenon of genetic instability, related to DNA amplification in *Streptomyces ambofaciens* // J.Bacteriol.1989.Vol.171.P.419-423.
10. Nastasiak I., Zavorotnaya S., Shengofer N. et al. Properties of *Streptomyces ambofaciens* mutants with altered resistance to antibiotics // Theses 9 Int.Symp.Biol.Actinom.1994.Moskow. P.104.
11. Omura S., Tanaka Y. Biochemistry, regulation and genetics of macrolide production. // In: Macrolide antibiotics: chemistry, biology and practice. Ed.Omura S. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.1984. P.199-299.
12. Richardson M.A., Kuhstoss S., Huber M.L, et al. Cloning of spiramycin biosynthetic genes and their use in constructing *Streptomyces ambofaciens* mutants defective in spiramycin biosynthesis // J.Bacteriol.1990.Vol.172.P.3790- 3798.

**GENETIC INSTABILITY OF STREPTOMYCES AMBOFACIENS RESISTANCE
TO CHLORAMPHENICOL****V. Fedorenko**

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

The resistance of spiramycin producer, *S. ambofaciens* to chloramphenicol is an unstable trait. Spontaneous mutants sensitive to chloramphenicol (Cml^s) arise in the culture of *S. ambofaciens* with high frequency (ca. 10^{-3}) and after step-by-step selection it produces spontaneous mutants with raised resistance to chloramphenicol (Cml^r). The correlation between Cml^r / Cml^s phenotypes and resistance / sensitivity to macrolides and lincomycin was shown. Cml^r - mutants are characterised by lower variability of antibiotic activity level comparable to parental strains of *S. ambofaciens*. Amplification of nucleotide sequences were not found in total DNA of *S. ambofaciens* 1115 and its Cml^r and Cml^s - mutants in contrary to another wild type strain *S. ambofaciens* 792 and its antibiotic resistant mutants.

Key words: Streptomyces, antibiotics, chloramphenicol, resistance.

Стаття надійшла до редколегії 02.09.1999
Прийнята до друку 21.04.2000

