

Генетика

УДК 579. 873.71

ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТІВ ШТАМУ *STREPTOMYCES PEUCETIUS* SUBSP. *CAESIUS* ATCC 27952-2, СТІЙКИХ ДО ХЛОРАМФЕНІКОЛУ

Л. Дубицька, В. Федоренко

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

Досліджено рівні антибіотичної активності й стійкість до антибіотиків штаму *S.peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2 та його хлорамфенікол-резистентних мутантів. У *Sm^r*-мутантів виявлено зниження загальної антибіотичної активності порівняно з вихідним штамом 27952-2. Проте 92,8% таких мутантів, отриманих після обробки штаму 27952-2 N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином, синтезувало DXR та його інтермедіати. В двох мутантів рівень синтезу DXR збільшився у 1,8–2,0 рази порівняно з вихідним штамом.

Ключові слова: *Streptomyces peucetius*, антибіотична активність, резистентність до хлорамфеніколу.

Структурні та регуляторні гени, що контролюють біосинтез антрациклінів, а також гени резистентності до власних антибіотиків формують кластери і функціонують координовано [15]. Відомо, що підвищення стійкості актиноміцетів до власного антибіотика часто корелює з їхньою високою антибіотичною активністю [2]. Раніше ми довели, що в мутантів продуцента даунорубіцину (DNR) та доксорубіцину (DXR) *S. peucetius* subsp. *caesius* підвищення стійкості до власних антибіотиків зумовлює зростання їхнього біосинтезу [4]. Крім того, відомо, що мутації стійкості до інших антибіотиків, зокрема тих, які впливають на процеси транскрипції, трансляції та транспорту метаболітів, можуть виявляти плейотропний ефект на антибіотикоутворення. Наприклад, серед мутантів низки штамів-актиноміцетів, стійких до хлорамфеніколу, стрептоміцину, рифампіцину, тіострептону та інших антибіотиків, виявлено такі, у яких підвищений рівень синтезу антибіотика [2, 6, 11, 13, 15]. Однак дані щодо виникнення та властивості мутантів *S. peucetius* subsp. *caesius*, стійких до таких антибіотиків, а також можливостей їхнього використання у селекції цих культур, обмежені.

Нашою метою було отримання та вивчення мутантів штаму *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952, стійких до хлорамфеніколу, і з'ясування доцільності використання їх у селекції штаму на підвищений біосинтез антрациклінів.

Штам *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952 отриманий з колекції культур РНЦА, Москва. Морфологічний варіант цього штаму, який має сіре забарвлення спор (27952-2), отриманий авторами [3]. Штам 27952-2 вирощували на середовищі Чапека [1], а для визначення антибіотичної активності – на середовищі КС [1]. Вивчення рівнів стійкості штамів до антибіотиків, отримання мутантів і визначення загальної антибіотичної активності виконували за описаними методами [2].

Досліджено виникнення спонтанних та індукованих N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином (НГ) хлорамфенікол-резистентних (Cml^r)-мутантів штаму 27952-2. Спонтанні Cml^r-мутанти штаму 27952-2 виникали з частотою $5,3 \cdot 10^{-4}$, на мінімальному середовищі МС з 5 мкг/мл хлорамфеніколу (СМ). Частота мутантів, стійких до вищих концентрацій СМ, була меншою і становила лише $3,3 \cdot 10^{-8}$ у разі відбору мутантів на середовищі з 20 мкг/мл СМ. Обробка спор цього штаму НГ зумовлює зростання частоти виникнення Cml^r-мутантів у 10^2 – 10^3 разів (табл. 1).

Таблиця 1

Частота виникнення Cml^r-мутантів штаму *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2

Концентрація антибіотика, мкг/мл	Частота виникнення Cml ^r -мутантів	
	спонтанні	НГ-індуковані
5	$(5,3 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$	$(3,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-2}$
10	$(3,4 \pm 1,2) \cdot 10^{-6}$	$(2,4 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$
20	$(3,3 \pm 0,7) \cdot 10^{-8}$	$(2,3 \pm 1,2) \cdot 10^{-5}$

Визначено рівні стійкості 123 Cml^r-мутантів за допомогою висівання суспензій спор на МС з різними концентраціями СМ. Досліджені мутанти за рівнями стійкості до СМ зачислені до трьох груп. Криві виживання трьох мутантів (Cml2014, Cml209, Cml1031), які є представниками цих груп, показані на рис. 1. Як видно з наведених даних, на МС з 5 мкг/мл СМ спостерігали 100% виживання спор серед мутантів першої групи (Cml 2014), тоді як рівні виживання мутантів другої (Cml 209) та третьої (Cml 1031) становили 10 та 2%, відповідно. Суттєві відмінності в рівнях стійкості до СМ можуть свідчити про наявність декількох детермінант, які за безпечують резистентність до цього антибіотика. Зокрема відомо [7], що стійкість мікроорганізмів до СМ може виникати внаслідок мутацій, які спричиняють зміни проникності клітинної мембрани для хлорамфеніколу, та модифікації 23S р РНК, що є мішенню дії цього антибіотика. Стійкість до СМ може бути зумовлена також і його інактивацією хлорамфенікол-ацетилтрансферазою, ферментом, який синтезують резистентні штами [16], чи хлорамфенікол-гідролазою, яка інактивує СМ за допомогою відщеплення дихлорацетильного залишку [9].

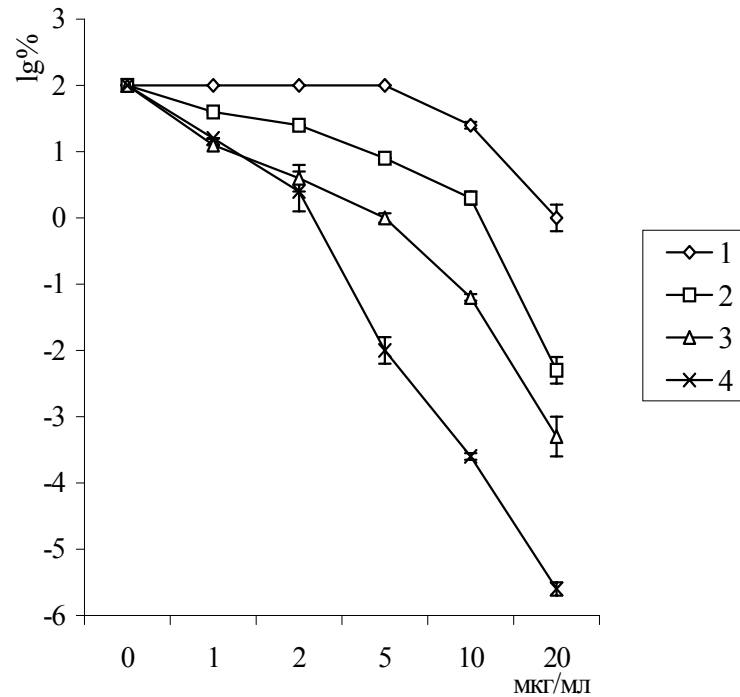


Рис. 1. Залежність виживання спор штамів *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2 від концентрації хлорамфеніколу в МС: За віссю абсцис-концентрація антибіотика в МС, мкг/мл. За віссю ординат-виживання спор, lg%: 1 – Cml2014, перша група; 2 – Cml209, друга група; 3 – Cml1031, третя група; 4 – штам 27952-2.

Також визначено спектри стійкості шести Cml^I-мутантів штаму 27952-2 (по два мутанти кожної групи) до еритроміцину, олеандоміцину, лінкоміцину, стрептоміцину, мономіцину, канаміцину, гентаміцину, тетрацикліну, рифампіцину, ампіциліну та карбеніциліну на МС. Одержані дані (табл. 2) порівняно з спектрами резистентності вихідного штаму 27952-2. З'ясовано, що досліджені штами мають спектри стійкості, подібні до більшості використаних антибіотиків. Є лише декілька відмінностей за дослідженими ознаками: всі Cml^I-мутанти виявились стійкішими до еритроміцину, у двох мутантів (Cml2 та Cml4) зростала чутливість до тетрацикліну, в інших двох (Cml1 та Cml6) – до стрептоміцину. Отже, Cml^I-мутанти штаму 27952-2, подібно до більшості таких мутантів штавів-

актиноміцетів, мають змінені спектри стійкості до деяких антибіотиків порівняно з вихідним штамом [6]. Наприклад, у *E. coli*, подібно до штаму 27952-2, ідентифіковані мутації в гені 23S рРНК, що спричиняють одночасну стійкість до СМ та еритроміцину [5].

Таблиця 2
Спектри стійкості Cml^F-мутантів штамів *S. peucetius* subsp *caesius* ATCC 27952-2 до антибіотиків на МС

Антибіотик	Мкг/мл	Діаметр зони пригнічення росту штаму, мм						
		27952-2	Cml ^F -мутанти штаму 27952-2					
			1	2	3	4	5	6
Еритроміцин	15	37,7±3,7	20,3±1,6	14,9±1,9	22,4±2,0	17,3±1,5	17,6±0,7	20,4±1,7
Олеандоміцин	15	38,7±3,7	28,4±0,5	29,6±1,3	31,7±3,2	27,4±4,8	31,3±1,9	30,2±0,7
Лінкоміцин	15	17,5±7,5	16,5±4,3	16,3±4,6	14,9±3,8	17,4±1,5	17,2±1,2	14,7±2,4
Стрептоміцин	30	31,3±4,3	40,4±2,9	28,2±3,9	30,5±1,7	28,3±4,5	27,9±4,5	39,5±0,9
Мономіцин	30	25,6±3,9	22,3±4,7	22,2±6,5	24,3±4,5	24,7±3,8	22,4±4,1	21,6±6,3
Канаміцин	30	26,3±3,9	29,7±1,5	20,4±4,1	29,6±2,4	18,6±1,5	22,2±3,4	29,8±4,6
Тетрациклін	30	30,0±2,9	33,3±4,1	39,7±3,8	30,2±2,7	40,4±2,1	34,5±3,9	30,4±4,2
Гентаміцин	10	15,5±0,5	18,2±2,1	17,8±0,3	18,7±4,7	17,8±0,7	19,3±1,6	20,5±2,9
Рифампіцин	5	43,0±1,0	45,5±0,7	38±7,4	45±4,6	40±3,8	45±6,5	43±4,7
Хлорамфенікол	30	23,3±1,0	0	0	0	0	0	0
Ампіцилін	10	0	0	0	0	0	0	0
Карбеніцилін	10	7,3±4,1	10±3,8	10,6±2,7	10,4±1,7	9,3±0,6	11,4±1,0	10,1±0,2
Оксацилін	25	0	0	10,0±0,5	0	0	0	0
Пеніцилін	10 од	0	0	0	0	0	0	0
Цефалоспорин	15	0	0	8,0±0,0	0	0	0	0
Поліміксин М	30 од	9,0±0,6	8,2±1,2	9,3±0,7	10,2±0,5	8,4±0,3	9,5±1,5	9,8±0,6

Оскільки мутації стійкості до антибіотиків можуть впливати й на антибіотикоутворення [2,6], то визначено рівні антибіотичної активності 34 спонтанних і 105 НГ-індукованих Cml^F-мутантів штаму 27952-2. Отримані результати порівню-

вали з даними вивчення антибіотичної активності окремих клонів вихідного штаму та клонів цього штаму, отриманих після дії на них НГ.

Середнє значення загальної антибіотичної активності в спонтанних і НГ-індукованих Cml^{I} -мутантів штаму 27952-2 на 18 та 38% нижче від значень активності в спонтанних клонів вихідного штаму та його клонів, оброблених НГ, відповідно (табл. 3). Серед усіх Cml^{I} -мутантів не виявлено „плюс”-варіантів, обробка спор цього штаму НГ із подальшою селекцією за стійкістю до хлорамфеніколу призвела до появи „мінус”-варіантів із частотою 3,81%.

Таблиця 3

Характеристика Cml^{I} -мутантів штаму *S. peucetius* subsp *caesius* ATCC 27952-2 за антибіотичною активністю

Показники	Штам 27952-2	Оброблені НГ	Cml^{I} -мутанти	
			спонтанні	НГ-індуковані
Кількість досліджених клонів, n	89	100	34	105
*Середнє значення антибіотичної активності, М%	100	120,3±3,1	82,4±2,4	82,3±1,4
Частка „плюс”-варіантів, %	1,1	9,0	0	0
Частка „мінус”-варіантів, %	0	0	0	3,8
Коефіцієнт варіації, CV%	31,6	28,3	34,8	31,3

* За 100% прийнято середнє значення антибіотичної активності вихідного штаму (27952-2).

Антибіотична активність продуцентів антрациклінів, зумовлена синтезом не тільки DNR і DXR, а й низкою інших антибіотичних сполук, що є попередниками або ж шунтовими сполуками біосинтезу DXR [10]. Тому за допомогою методу тонкошарової хроматографії [7] ми дослідили якісний склад антрациклінових сполук, що їх утворюють Cml^{I} -мутанти, антибіотична активність яких вища, ніж у вихідного штаму.

Серед 22 перевічених клонів вихідного штаму 27952-2 у семи (30,4%) виявлено DXR, у шести (26,1%) – DNR лише в трьох (13,0%) – DNR та DXR (табл. 4). Антибіотичну активність решти (30,4%) клонів визначають, очевидно, інші неідентифіковані нами антрациклінові сполуки. Серед спонтанних Cml^{I} -мутантів не виявлено DNR, а DXR виявлено лише в 28,6%. Однак у 42,9% таких мутантів виявлено 13-дигідродаунорубіцин (13-DHD) – сполуку, яка може бути попередником DXR [7]. Обробка штаму 27952-2 НГ призводить до зростання частки кло-

нів, які утворюють DNR (38,5%). Лише в 26% клонів виявлено DXR, а в 10,3% – 13 DHD. Утворювати DNR та DXR здатні 20,5% усіх НГ-індукованих клонів штаму 27952-2.

Таблиця 4

Якісний склад антрациклінових сполук, які виявлені в екстрактах CmI^F -мутантів штаму *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 17952-2

Ідентифіковані антрациклінові сполуки	Кількість			
	спонтанні		отримані після обробки НГ	
	клони 27952-2	CmI^F -мутанти	клони 27952-2	CmI^F -мутанти
	Виявлено лише			
DXR	0	0	0	2
DNR	0	0	0	0
*Неідентифіковані сполуки	7	8	9	2
	*Неідентифіковані сполуки			
DXR	7	0	1	8
DNR	6	0	15	0
DXR DNR	3	0	7	0
DXR 13-DHD	0	4	0	16
DNR 13-DHD	0	0	1	0
DNR, DXR 13-DHD	0	0	1	0
13-DHD	0	2	2	0
Кількість перевічених штамів	23	14	39	28

*Сполуки які розділяються в системі розчинників $CHCl_3:CH_3COOH:C_2H_5OH:H_2O$ (80:20:16:6).

Серед НГ-індукованих CmI^F -мутантів кількість клонів, які синтезують DXR, більша, ніж серед спонтанних CmI^F - або НГ-індукованих мутантів. У 7,1% виявлено лише DXR, а в 85,7 – DXR та інші антрацикліни. Антибіотична активність у 7,1% НГ-індукованих CmI^F -мутантів визначена лише попередниками DNR.

З огляду на кількість фракцій у хроматограмах НГ-індуковані CmI^F -мутанти утворюють більше (два-п'ять) інтермедіатів біосинтезу DXR порівняно з вихідним

штамом (один-три) та спонтанними Cml^I -мутантами (один-два). Проте в таких мутантів забарвлення зон, які рухаються з фронтом розчинника, слабше, що, очевидно, свідчить про інтенсивніший синтез кінцевих сполук.

У чотирьох Cml^I -мутантів, відібраних за підвищеною антибіотичною активністю, на підставі даних хроматографічного аналізу та стабільності збереження ознаки стійкості до хлорамфеніколу визначено кількість синтезованих антрациклінових сполук [14]. З'ясовано, що такі мутанти нагромаджують у міцелії в 1,7–3,2 рази вищі кількості антрациклінів порівняно з вихідним штамом (рис. 2). Жоден із досліджених Cml^I -мутантів не синтезував вищих кількостей DNR, проте у двох мутантів (НГ-індукованих) синтез DXR збільшився в 1,8–2,0 рази порівняно з вихідним штамом.

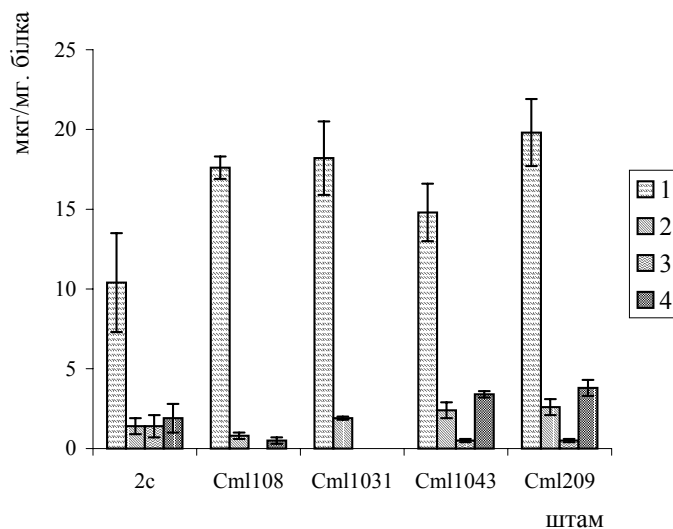


Рис. 2. Кількість антрациклінових сполук, що їх синтезують Cml^I -мутанти штаму 27952-2: 1 – кількість антрациклінів у міцелії; 2 – кількість антрациклінів у середовищі; 3 – кількість DNR; 4 – кількість DXR, мкг/мг білка.

Отже, аналіз фенотипів отриманих мутантів дає змогу припустити, що мутації, стійкі до хлорамфеніколу, можуть виникати в різних детермінантах. У таких мутантів змінюється резистентність до низки антибіотиків, а в більшості з них знижується антибіотична активність, що відбувається, очевидно, внаслідок зменшення кількості проміжних сполук біосинтезу DXR, про що свідчать дані хроматографічного аналізу. В результаті проведеної роботи отримано два високоактивні Cml^I -мутанти, які мають підвищений рівень синтезу DXR і можуть бути використані для подальшої селекції на підвищення активності цього штаму. Отже, серед

НГ-індукованих хлорамфенікол – резистентних мутантів доцільно вести селекцію штаму *S. peucetius* subsp. *caesius* 27952–2 на підвищення біосинтезу DXR.

1. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешикова М.А. и др. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 245 с.
2. Демидчук Ю.А., Голец Л.М., Федоренко В.А. Характеристика мутантов *Streptomyces kanamyceticus*, устойчивых к аминогликозидным антибиотикам // Антибиотики и химиотерапия. 1996. Т. 44. № 6. С. 15–20.
3. Дубицька Л., Заворотна С., Остап Б. та ін. Характеристика ознак стійкості до антибіотиків у продуцентів протипухлинних антибіотиків *S. globisporus* 1912, *S. peucetius* ATCC 29050 *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952 // Вісник ЛНУ. Сер. біол. 2000. Вип. 25. С. 50–60.
4. Настасяк И.Н. Получение и характеристика мутаций у штаммов *Sacharopolispora erythraea*, влияющих на биосинтез антибиотика эритромицина: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 1992.
5. Федоренко В.О., Басілія Л.І., Панькевич К.О. та ін. Генетичний контроль біосинтезу актиноміцетами протиракових антибіотиків-полікетидів // Білетень Ін-ту сільгосп. мікробіології. 2000. № 8. С. 27–31.
6. Cundliffe E. On the nature of antibiotic binding sites in ribosomes // Biochimica. 1987. Vol. 69. N 8. P. 863–869.
7. Dickens M.L., Strohl W.R. Isolation and characterization of a gene from *Streptomyces* sp. strain C5. that confers the ability to convert daunorubicin to doxorubicin on *Streptomyces lividans* TK 24 // J Bacteriol. 1996. Vol 18. P. 3389–3395.
8. Dittrich W., Kessler A., Betler M. et al. Characterization of unstable tetracycline and chloramphenicol resistance genes in *Streptomyces lividans* 66 // Folium Mikrobiol. 1990. Vol. 13. N 1–2. P. 49.
9. Hopwood D.A., Bibb H.J., Chater K.F. et. al. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. The John Innes Foundation. Norwich, England. 1985.
10. Hosoya Y., Okamoto S., Muramatsu H., Ochi K. Acquisition of certain streptomycin-resistant (str) mutations enhances antibiotic production in bacteria // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1998. Vol. 20. P. 2041–2047.
11. Hutchinson R. Biosynthetic studies of daunorubicin and tetracenomycin C // Chem. Rev. 1997. Vol. 97. P. 2525–2535.
12. Malik W.S., Vining L.C. Metabolism of chloramphenicol by the producing organism. // Some properties of chloramphenicol. 1971. Vol. 17. P. 1287–1290.
13. Ochi K. A rel mutation abolishes the enzyme induction needed for actinomycin synthesis by *Streptomyces antibioticus* // Biol. Chem. 1987. Vol. 51. N 3. P. 829–835.

14. Segura D., Sahtana C., Cosh R. et al. Antracyclines: isolation of overproducing strains by the selection and genetic recombination of putative regulatory mutants of *Streptomyces peucetius* var. *caesius*// *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997. Vol. 48. P. 615–620.
15. Shima J., Hesketh A., Okamoto S. et al. Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S 12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2)// *J. Bacteriol.* 1996. P. 7276–7284.
16. Shaw W. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistance bacteria// *Meth. in Enzymol.* 1975. Vol. 43. P. 737–755.

**THE CHARACTERIZATION OF *STREPTOMYCES PEUCETIUS*
SUSP. *CAESIUS* ATCC 27952-2 MUTANTS RESISTANT TO
CHLORAMPHENICOL**

L. Dubytska, V. Fedorenko

*Ivan Franko National University of L'viv,
Hrushevskoho st. 4, L'viv 79005, Ukraine,
e-mail: genetic@franko Lviv. ua.*

The antibiotic activity level and resistance to antibiotics of the strain *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2 and its chloramphenicol-resistant mutants have been investigated. *Cml^r*-mutants demonstrate decreased total antibiotic activity in comparison to strain 27952-2. However 92,8% *Cml^r*-mutants, obtained after N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin treatment of strain 27952-2 synthesized DXR and its intermediates. Two mutants among them are characterized by increasing of DXR production level (1,8-2 fold in comparison to initial strain 27952-2).

Keywords: *Streptomyces peucetius*, antibiotic activity, resistance to chloramphenicol.

Стаття надійшла до редколегії 27.05.2001
Прийнята до друку 25.07.2001