

## Генетика

УДК 567.809.55

**ХАРАКТЕРИСТИКА ОЗНАК СТІЙКОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ  
У ПРОДУЦЕНТА ТІОПЕПТИДНОГО АНТИБІОТИКА СІОМІЦИНУ  
*STREPTOMYCES SIOYAENSIS* LV81****Я. Грубський, М. Лопатнюк, М. Мироновський, Б. Остап,  
О. Громико, В. Федоренко***Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua*

Досліджено ознаки стійкості продуцента тіопептидного антибіотика сіоміцину *S. sioyaensis* Lv81 до антибіотиків із різним механізмом дії. Штамові дикого типу *S. sioyaensis* Lv81 властива природна стійкість до β-лактамних антибіотиків і поліміксину. Цей штам має високий рівень стійкості до тіостептону – найближчого за структурою до сіоміцину тіопептидного антибіотика. Однак він виявляє чутливість до низьких концентрацій рифампіцину та стрептоміцину, а також більш чутливий до макролідних антибіотиків – олеандоміцину й еритроміцину, ніж більшість досліджених стрептоміцетів. Вивчено вплив різних концентрацій стрептоміцину, рифампіцину й еритроміцину на виживання спор *S. sioyaensis* Lv81. З частотою близько  $1 \times 10^{-7}$ – $2 \times 10^{-8}$  виникають спонтанні стрептоміцин- і рифампіцин-резистентні мутанти *S. sioyaensis* Lv81. Обидві групи мутантів гетерогенні за рівнем стійкості до цих антибіотиків.

*Ключові слова:* *S. sioyaensis*, сіоміцин, стрептоміцин-стійкість, рифампіцин-стійкість.

Сіоміцин А – тіопептидний антибіотик, який продукується актиноміцетним штамом *Streptomyces sioyaensis* Lv81 (=NRRL-B5408). Цей антибіотик пригнічує синтез білка у грам-позитивних бактерій, активний проти збудника малярії *Plasmodium falciparum*, а також діє як імуносупресант і протипухлинний агент [6, 25]. Незважаючи на великий біотехнологічний інтерес, який становлять тіопептиди і, зокрема, сіоміцин А, закономірності їхнього біосинтезу, а також його генетичний контроль вивчені слабо. Донедавна вважали, що тіопептиди синтезуються за допомогою нерибосомних пептидсинтетаз. Однак, клонувавши кластер генів біосинтезу сіоміцину і дуже близького до нього за будовою тіострептону, довели, що їхній пептидний попередник синтезується на рибосомах [17]. На сьогодні опрацьовано методи клонування генів у клітинах *S. sioyaensis*, вивчено мінливість продуцента сіоміцину за рівнем антибіотичної активності, а також вплив мутагенів на життєздатність штаму і синтез антибіотика [1, 18]. Цим зроблено перші кроки у створенні ефективної системи селекції продуцента сіоміцину й отримання штамів, здатних до посиленого синтезу цього антибіотика.

Важливою характеристикою актиноміцетів як продуцентів антибіотиків є рівень їхньої стійкості до цих сполук. Відомо, що актиноміцетам властива природна резистентність як до власних, так і до інших антибіотиків [3–5]. Функціонування генів природної резистентності, а також мутації, що змінюють стійкість до антибіотиків, можуть сильно впливати на рівень синтезу вторинних метаболітів у актиноміцетів [2–4]. Однак дотепер штам-продуцент сіоміцину *S. sioyaensis* не був вивчений щодо ознак стійкості до анти-

біотиків. Не було з'ясовано, як ці ознаки, а також мутації антибіотикорезистентності впливають на антибіотичну активність *S. sioyaensis* і чи можна їх використати у селекції штамів-продуцентів сіоміцину. Тому метою нашої роботи було вивчення *S. sioyaensis* за ознаками стійкості до антибіотиків, отримання і вивчення мутантів з підвищеною резистентністю до антибіотиків.

У роботі використано штам *S. sioyaensis* Lv81(=NRRL-B5408) із Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків ЛНУ імені Івана Франка, а також його похідні, виділені під час виконання цієї роботи. Для отримання спор штам *S. sioyaensis* вирощували на вівсяному середовищі [1, 2] за температури 28°C. Резистентність штамів *S. sioyaensis* до антибіотиків визначали методом дифузії в агар з використанням дисків з антибіотиками виробництва LACHEMA (Чехія) і ВО “НИЦФ” (Росія), титруванням спор і відбитками колоній на соєве середовище №14 (СС-14) [1, 2]. Спонтанні рифампіцин-резистентні (Rif<sup>R</sup>) і стрептоміцин-резистентні (Str<sup>R</sup>) мутанти *S. sioyaensis* виділяли й аналізували за раніше описаними методиками [2, 5].

На першому етапі роботи ми дослідили спектр стійкості штаму *S. sioyaensis* до антибіотиків із різним механізмом дії та порівняли його зі спектрами *S. nogalater* IMET 43360, продуцента антрациклінового антибіотика ногаламіцину, який має дещо нетиповий для стрептоміцетів спектр стійкості до антибіотиків [2], і *S. globisporus* 1912-2, продуцента ангуциклінового антибіотика ландоміцину Е, якому, навпаки, властивий типовий спектр стійкості [3]. Штамові дикого типу *S. sioyaensis* Lv81, як і більшості досліджених стрептоміцетів, властива стійкість до β-лактамних антибіотиків і поліміксину [4]. Однак за стійкістю до β-лактамних антибіотиків він різниться від *S. nogalater*, який виявляє чутливість до всіх β-лактамів, крім оксациліну. Більшість досліджених штамів стрептоміцетів конститутивно продукують β-лактамази. Стійкість актиноміцетів до β-лактамів може бути зумовлена й дуже низькою афінністю до них пеніцилін-зв'язуючих білків [19]. Імовірно, що природна резистентність *S. sioyaensis* до цих антибіотиків також зумовлена цими причинами.

Цікавою особливістю *S. sioyaensis* є те, що він значно чутливіший до макролідних антибіотиків – олеандоміцину й еритроміцину, ніж *S. nogalater* і *S. globisporus*. Однак за чутливістю до лінкоміцину – антибіотика групи лінкозамідів – усі три види актиноміцетів майже не відрізняються. Дещо вищий рівень природної стійкості до лінкоміцину, порівняно зі стійкістю до макролідів, характерний для багатьох стрептоміцетів. Однак різниця у чутливості *S. sioyaensis* до лінкоміцину і макролідів значно більша (табл. 1), ніж це описано для абсолютної більшості штамів *Streptomyces* [4]. Найбільш розповсюдженим виявом стійкості бактерій до макролідних антибіотиків є так званий MLS<sup>R</sup>-фенотип (резистентність до макролідів, лінкозамідів і стрептограмінів типу В). Незважаючи на велику структурну різноманітність, антибіотики, що належать до цих груп, конкурують за сайти зв'язування з рибосомами та інгібують синтез білка. MLS-резистентність визначається N<sup>6</sup>-метилуванням аміногруп залишку аденозину А-2058 у 23S рРНК, що здійснюється перед її включенням у 50S субодиницю рибосоми. Описано два варіанти MLS-резистентності, які різняться головним чином за рівнем стійкості до певних макролідів: MLS-I, що контролюється генами *erm*-типу I і зумовлений N<sup>6</sup>-мометилуванням А-2058 та MLS-II, що детермінований генами *erm*-типу II (N<sup>6</sup>-диметилування цього ж залишку) [24, 26]. Штами, яким властивий фенотип MLS-I, мають високий рівень стійкості до лінкозамідів і різні рівні стійкості до макролідів, які нижчі за ті, що визначаються генами *erm*-типу II. Таких актиноміцетів виявлено значно

більше, ніж тих, яким властивий фенотип MLS-I [13, 21]. У актиноміцетів виявлено ферменти, що інактивують макролідні антибіотики. Найчастіше вони глікозилюють їх у 2'-позиції [24]. Ця активність виявлена у деяких штамів, що не синтезують макролідних антибіотиків, наприклад, у одного з модельних штамів *S. lividans* [11, 12], і вона може визначати їхню резистентність до екзогенних макролідів. Однак порівняння наших даних з даними літератури про стійкість *S. lividans* [11, 12] свідчить, що *S. sioyaensis* значно чутливіший до макролідів, ніж *S. lividans*. Отримані дані дають змогу зробити висновок, що й для *S. sioyaensis* не властивий жоден із типових для стрептоміцетів фенотипів природної стійкості до макролідів, що, можливо, зумовлено відсутністю в його геномі «класичних» *erm*-генів і генів, продукти яких глікозилюють ці антибіотики.

Рифампіцин сильніше пригнічує ріст *S. sioyaensis*, ніж *S. nogalater* і *S. globisporus*. Відомо, що серед досліджених штамів актиноміцетів спостерігається велика різниця за чутливістю до цього інгібітора РНК-полімерази [4]. Причини цього явища не цілком зрозумілі. Стійкість до рифампіцину у продуцентів цього антибіотика зумовлена наявністю у їхніх клітинах РНК-полімераз, стійких до нього [8]. Однак це не пояснює відносно рифампіцин-стійкості штамів актиноміцетів, які не продукують рифампіцину, наприклад *S. nogalater*. У літературі наводять приклад іншого механізму рифампіцин-резистентності актиноміцетів – за рахунок змін проникності клітинної мембрани для цього антибіотика [10]. Високий рівень чутливості *S. sioyaensis* до рифампіцину вказує на відсутність у нього цих механізмів резистентності. Однак *S. sioyaensis* стійкіший до тетрацикліну порівняно з *S. nogalater* і *S. globisporus*. Натомість за стійкістю до аміноглікозидних антибіотиків канаміцину, стрептоміцину і гентаміцину, досліджуваний штам виявляє високу чутливість, як і більшість досліджених актиноміцетів [4], у тому числі *S. nogalater* і *S. globisporus*.

Ми зосередилися на більш детальному вивченні стійкості *S. sioyaensis* до рифампіцину, стрептоміцину, еритроміцину, тіострептону і лінкоміцину. За допомогою титрування спор на середовищі СС-14 визначили рівні стійкості *S. sioyaensis* до цих антибіотиків і порівняли їх із рівнями стійкості *S. nogalater* і *S. globisporus*. Результати наведено на рис. 1. Як видно з рис. 1, А, на середовищах з усіма використаними концентраціями стрептоміцину виживання штаму *S. sioyaensis* було вищим, ніж виживання *S. globisporus*, але нижчим, ніж *S. nogalater*. Наприклад, за концентрації стрептоміцину у середовищі 1 мкг/мл виживання *S. sioyaensis* і *S. globisporus* коливалося в межах  $10^{-2}$ – $10^{-3}$ % (рис. 1, А). За цієї ж концентрації антибіотика виживання спор *S. nogalater* становило 0,1%. На середовищі, що містило 3 мкг/мл стрептоміцину і більше, росту штамів *S. sioyaensis* та *S. globisporus* не спостерігали. Натомість за концентрації 15 мкг/мл цього антибіотика у середовищі відсоток виживання спор штаму *S. nogalater* становив  $10^{-5}$  (рис. 1, А). Отже, криві виживання свідчать про те, що *S. sioyaensis* є значно чутливіший до дії стрептоміцину, ніж *S. nogalater*, але стійкіший, ніж *S. globisporus*.

Титрування спор *S. sioyaensis* на СС-14 зі зростаючими концентраціями рифампіцину (рис. 1, Б) підтвердили дані табл. 1 про його високу чутливість до цього антибіотика. За дуже низької концентрації рифампіцину (0,01 мкг/мл) виживало 46,4% спор. Збільшення вмісту цього антибіотика в середовищі зумовлює різке падіння виживання культури. Так, при 0,5 мкг/мл рифампіцину виживання знижувалось аж до  $2,6 \times 10^{-6}$ %. Дані, наведені на рис. 1, Б, свідчать про вищу чутливість *S. sioyaensis* до рифампіцину порівняно з *S. nogalater* і *S. globisporus*. Так, за концентрації антибіотика 1 мкг/мл спостерігалася повна загибель спор *S. sioyaensis*, натомість виживало 1 та 76% спор штамів *S. nogalater* і *S. globisporus* відповідно (рис. 1, Б).

Таблиця 1  
Спектри стійкості до антибіотиків *S. siouaensis* Lv81 і його мутантів, а також *S. nogalater* ІМЕТ43360 і *S. globisporus* 1912-2

Антибіотик	Концентрація, мкг/диск	Діаметр зон пригнічення росту, мм					
		Штами					
		<i>S. siouaensis</i> Lv81	<i>S. siouaensis</i> Str9S	<i>S. siouaensis</i> if50S	<i>S. siouaensis</i> Rif49S	<i>S. nogalater</i> ІМЕТ 43360	<i>S. globisporus</i> 1912-2
Олеандоміцин	15	33 ± 2	27 ± 1	30 ± 1	45 ± 2	12 ± 1	18 ± 1
Лінкоміцин	15	12 ± 1	0	13 ± 2	18 ± 1	9 ± 1	14 ± 1
Еритроміцин	15	43 ± 3	44 ± 1	44 ± 2	52 ± 2	20 ± 2	16 ± 1
Бензилпеніцилін	10	0	0	0	0	10 ± 1	0
Оксацилін	10	0	0	0	0	0	0
Карбеніцилін	25	0	0	0	0	12 ± 1	0
Цефалотин	30	0	0	0	0	15 ± 1	0
Ампіцилін	10	0	0	0	0	14 ± 1	0
Канаміцин	30	33 ± 1	24 ± 1	29 ± 1	32 ± 2	31 ± 2	34 ± 2
Стрептоміцин	30	30 ± 1	0	27 ± 2	33 ± 2	26 ± 2	36 ± 2
Гентаміцин	10	26 ± 1	30 ± 1	35 ± 1	45 ± 2	20 ± 1	27 ± 2
Хлорамфенікол	30	16 ± 1	24 ± 1	24 ± 2	22 ± 1	12 ± 1	14 ± 1
Рифаміцин	5	38 ± 2	30 ± 2	0	0	14 ± 1	26 ± 1
Тетрациклін	30	9 ± 1	8 ± 1	0	9 ± 1	25 ± 2	13 ± 1
Поліміксин М	300 од.	0	0	8 ± 1	10 ± 1	0	0

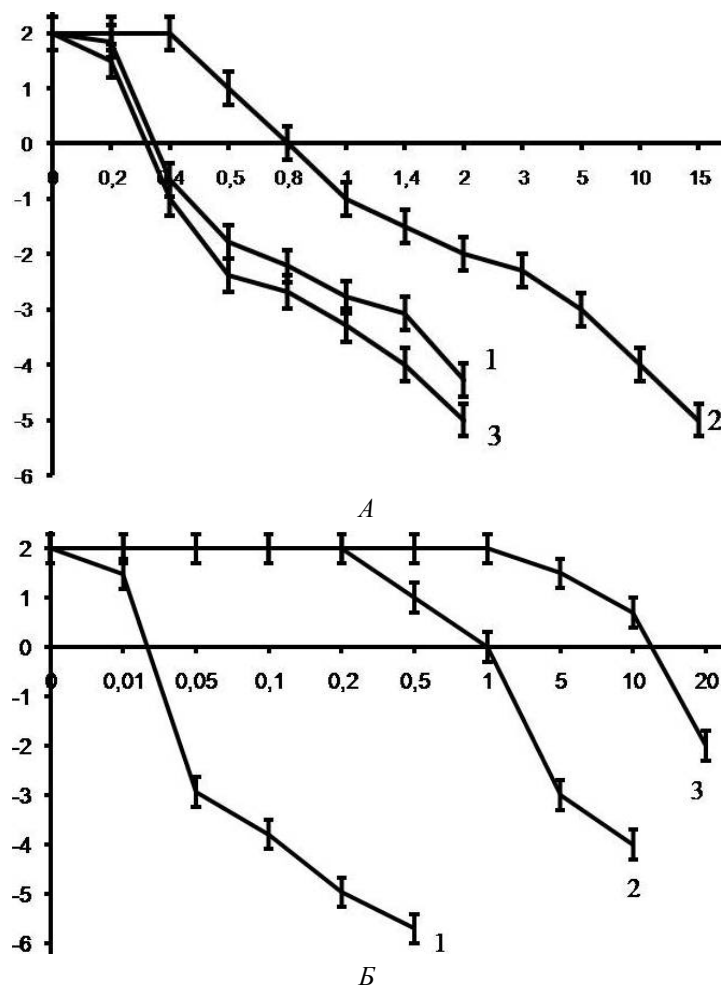


Рис. 1. Залежність виживання штамів *S. siayaensis* Lv81 (1), *S. nogalater* ІМЕТ 43360 (2) та *S. globisporus* 1912 (3) від концентрації стрептоміцину (А) і рифампіцину (Б) у середовищі СС-14. За віссю абсцис – концентрація антибіотика мкг/мл, за віссю ординат – lg % виживання спор.

Досліджуючи спектри резистентності до антибіотиків (табл. 1), ми виявили, що штам *S. siayaensis* чутливіший до макролідного антибіотика еритроміцину, ніж до лінкоміцину – антибіотика групи лінкозамідів. Порівнявши криві виживання спор, отримані за допомогою методу титрування (рис. 2), ми підтвердили ці дані. Так, за концентрації еритроміцину 0,1 мкг/мл відсоток виживання спор *S. siayaensis* знижувався до  $0,6 \times 10^{-5}$ , а за такої самої концентрації лінкоміцину виживало близько 95% спор. Можна припустити, що в клітині *S. siayaensis* можуть функціонувати гени, подібні до *lmrC* і *lmrA* у *S. lincolnsis*, продукти яких – АВС-транспортери – визначають високий рівень стійкості до лінкозамідів і не впливають на стійкість до еритроміцину й олеандоміцину [9, 27].

Цікавим є питання про рівень резистентності *S. siayaensis* до тіопептидних антибіотиків, зокрема до тіострептону – тіопептиду, дуже близького до сіоміцину за будовою і механізмом дії [6]. Титруючи спори *S. siayaensis* на середовищі з концентраціями

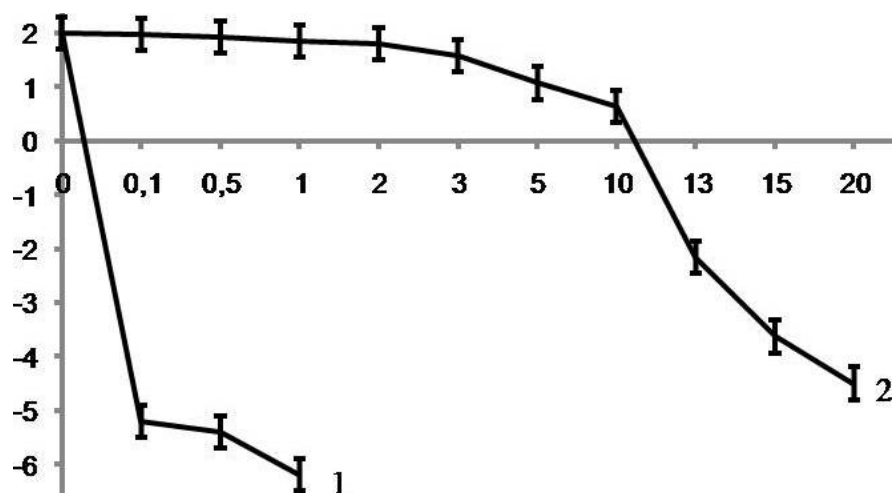


Рис. 2. Залежність виживання штамів *S. sioyaensis* Lv81 від концентрації еритроміцину (1) і лінкоміцину (2) у середовищі СС-14. За віссю абсцис – концентрація антибіотика мкг/мл, за віссю ординат – lg % виживання спор.

тіострептоні 100, 200 і 400 мкг/мл, ми спостерігали виживання 100% спор *S. sioyaensis*. Це свідчить про дуже високий рівень стійкості *S. sioyaensis* до тіострептоні. Очевидно, таким же високим є рівень стійкості *S. sioyaensis* до власного антибіотика сіоміцину. В актиноміцетів – продуцентів тіопептидних антибіотиків *S. azureus*, *S. laurentii*, *S. actuosus*, *S. bernensis* природна резистентність до власних антибіотиків визначається 2'-О-метилуванням залишку рибози нуклеотиду A1067 23S рРНК. Метилування залежить від вторинної структури петлі U1066-A1067-G1068-A1069-A1070 цієї рРНК, що включає сайт зв'язування антибіотиків [7, 23]. Ми припускаємо, що аналогічний механізм стійкості до власного антибіотика функціонує й у клітинах *S. sioyaensis*.

Мутації стійкості до антибіотиків, зокрема стрептоміцину або рифампіцину, можуть впливати на антибіотичну активність актиноміцетів, тому їх часто використовують у селекції [2, 5, 6]. Ми дослідили, чи виникають спонтанні мутанти *S. sioyaensis*, резистентні до стрептоміцину і рифампіцину.

Виявилось, що на середовищі зі стрептоміцином у концентрації 2 мкг/мл з частотою близько  $1,6 \times 10^{-7}$  виникають спонтанні стрептоміцин-резистентні ( $\text{Str}^R$ ) мутанти. Усі досліджені  $\text{Str}^R$ -мутанти поділено на дві групи. Першу становлять 88,6% мутантів, стійких до 5–20 мкг/мл антибіотика. Решта – це  $\text{Str}^R$ -мутанти, резистентні до значно вищих концентрацій стрептоміцину – 50–100 мкг/мл. Визначення спектру стійкості до інших антибіотиків виявило, що представник другої групи мутантів Str9S набув стійкості ще й до лінкоміцину. Також цей мутант виявляв більшу чутливість до канаміцину, гентаміцину і хлорамфеніколу порівняно із *S. sioyaensis* Lv81 (табл. 1).

Спонтанні рифампіцин-резистентні ( $\text{Rif}^R$ ) мутанти *S. sioyaensis* відбирали на середовищі із 0,5 мкг/мл рифампіцину з частотою близько  $2 \times 10^{-8}$ . Отримано і проаналізовано 210 спонтанних  $\text{Rif}^R$ -мутантів. Ці мутанти суттєво різнилися за рівнем стійкості до антибіотика. Переважна більшість (96,2%) була стійка до 5–20 мкг/мл. Лише 3,8% становили мутанти, резистентні до 50–100 мкг/мл. Серед них виявлено мутанти Rif49S і

Rif50S, які росли на середовищі з 100 мкг/мл рифампіцину. Зниження виживання спор цих мутантів спостерігали на середовищах з рифампіцином у концентраціях 500 і 1000 мкг/мл, причому вони дещо різнилися між собою за рівнем резистентності до найвищих концентрацій антибіотика (рис. 3).

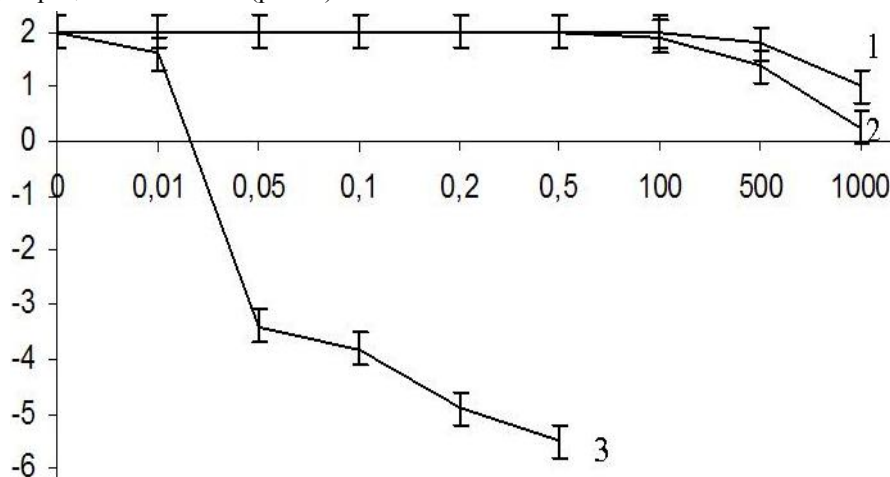


Рис. 3. Залежність виживання спор Rif<sup>R</sup>-мутантів Rif49S і Rif50S від концентрації рифампіцину у середовищі CC-14: 1 – Rif49S, 2 – Rif50S, 3 – *S. sioyaensis* Lv81. За віссю абсцисс – концентрація антибіотика мкг/мл, за віссю ординат – lg % виживання спор.

Як і Str<sup>R</sup>-мутанти, досліджені Rif<sup>R</sup>-мутанти мають певні зміни у спектрі стійкості до інших антибіотиків (табл. 1). Наприклад, Rif49S ще більш чутливий до еритроміцину і олеандоміцину, ніж вихідний штам. Обидва мутанти чутливіші до гентаміцину, хлорамфеніколу і поліміксину порівняно з *S. sioyaensis* Lv81. Натомість Rif50S набув резистентності до тетрацикліну.

Отже, обидві групи мутантів *S. sioyaensis* Lv81 гетерогенні за рівнем стійкості до антибіотиків. Значні відмінності у рівнях стійкості мутантів до стрептоміцину і рифампіцину спостерігали й у інших актиноміцетів [4]. Вони можуть бути зумовлені мутаціями різних генів, як це, наприклад, виявлено у *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* і *Saccharopolyspora erthraea*, але і різні мутації в одному гені *rpsL* також можуть зумовлювати подібну гетерогенність стійкості. Стійкість до високих концентрацій стрептоміцину, яка, наприклад, спостерігається у мутанта Str9S, може бути зумовлена певними мутаційними змінами, які виникли у гені *rpsL* [15, 16, 20]. Можна припустити, що висока резистентність до рифампіцину у мутантів Rif49S та Rif50S може бути спричинена як мутаціями у гені *rpoB*, який кодує β-субодиницю РНК-полімерази, так і мутаціями, які зменшують транспортування рифампіцину у клітину [10, 20]. Мутації в генах *rpoB* та *rpsL* також можуть суттєво впливати на синтез антибіотиків, як це виявлено для *S. coelicolor* A3(2) та *S. lividans* [16, 22].

Дані, отримані у роботі, мають важливе значення для подальшої генетико-селекційної роботи зі штамом *S. sioyaensis* Lv81. Мутації антибіотикорезистентності, які виникли під час виконання нашої роботи, можна використати як зручні маркери для проведення подальших генетичних досліджень. Виділені високорезистентні мутанти *S. sioyaensis* Lv81 можуть бути вихідним матеріалом для отримання подвійних мутантів.

Частина з них заслуговує уваги як потенційні надпродуценти сіоміцину.

1. Аравіцька О., Грубський Я., Мироновський М. та ін. Вплив ультрафіолетового опромінення на антибіотичну активність продуцента сіоміцину *Streptomyces sioyaensis* Lv81 // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2009. Вип. 50. С. 11–17.
2. Громико О., Кириченко Н., Федоренко В. Мутанти *S. nogalater* ІМЕТ 43360 з підвищеним рівнем синтезу протипухлинного антибіотика ноґаламіцину // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 35. С. 121–127.
3. Дубицька Л., Заворотна С., Остап Б. та ін. Характеристика ознак стійкості до антибіотиків у продуцентів протипухлинних антибіотиків *Streptomyces globisporus* 1912, *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 та *Streptomyces peucetius* supsp. *caesius* ATCC27952 // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2000. Вип. 25. С. 49–60.
4. Федоренко В. О. Генетичний контроль стійкості актиномицетів до антибіотиків та його роль у біосинтезі антибіотиків: Дис. ... д-ра біол. наук. Львів, 2004. 512 с.
5. Федоренко В. О., Остап Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Львів: Видавн. центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. 277 с.
6. Bagley M. C., Dale J. W., Merritt E. A., Xiong X. Thiopeptide antibiotics // Chem. Rev. 2005. Vol. 105. P. 685–714.
7. Bechthold A., Floss H. G. Overexpression of the thiostrepton-resistance gene from *Streptomyces azureus* in *Escherichia coli* and characterization of recognition sites of the 23S rRNA A1067 2'-methyltransferase in the guanosinetriphosphatase center of 23S ribosomal RNA // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 224. P. 431–437.
8. Blanco M. G., Hardisson C., Salas J. A. Resistance in inhibitors of RNA polymerase in actinomycetes which produce them // J.Gen.Microbiol. 1984. Vol. 130. P. 2883–2891.
9. Calcutt M. J., Cundliffe E. Cloning of a lincosamide resistance determinant from *Streptomyces caelestis*, the producer of celesticetin, and characterization of the resistance mechanism // J. Bacteriol. 1990. Vol. 172. P. 4710–4714.
10. Chater K. F. Rifampicin-resistant mutants of *Streptomyces coelicolor* A3(2) // J. Gen. Microbiol. 1974. Vol. 80. P. 277–290.
11. Cundliffe E. Resistance to macrolides and lincosamides in *Streptomyces lividans* and to aminoglycosides in *Micromonospora purpurea* // Gene. 1992. Vol. 115. P. 75–84.
12. Cundliffe E. Glycosylation of macrolide antibiotics in extracts of *Streptomyces lividans* // Antimicrob. Agents Chemother. 1992. Vol. 36. P. 348–352.
13. Cundliffe E., Merson-Davies L. A., Keleman G. H. Aspects of tylosin production and resistance in *Streptomyces fradiae* // Industrial microorganism: basic and applied molecular genetics / Ed. by R.H. Baltz, G.D. Hegeman, P.L. Skatrud. ASM: Washington, 1993. P. 235–243.
14. Hosoya Y., Okamoto S. Acquisition of certain streptomycin-resistant (Str) mutations enhances antibiotic production in bacteria // Antimicrob. Ag. and Chemother. 1998. Vol. 42. N 8. P. 2041–2047.
15. Hu H., Ochi K. Novel approach of improving the productivity of antibiotic producing strains by inducing combined resistant mutations // App. Env. Microbiol. 2001. Vol. 67. P. 1885–1892.



16. Hu H., Zhang Q., Ochi K. Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase  $\beta$  subunit) of *Streptomyces lividans*. // J. Bacteriol. 2002. Vol. 184. P. 3984–3991.
17. Liao R., Duan L., Lei C. et al. Thiopeptide biosynthesis featuring ribosomally synthesized precursor peptides and conserved posttranslational modifications // Chem. Biol. 2009. Vol. 16. P. 141–147.
18. Myronovskyy M., Ostash B., Ostash I. et al. A gene cloning system for the siomycin producer *Streptomyces sioyaensis* NRRL-B5408 // Folia Microbiol. 2009. Vol. 54. P. 91–96.
19. Ogawara H., Kawamura N., Kudo T. et al. Distribution of  $\beta$ -lactamase in *Actinomycetes* // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. Vol. 43. P. 3014–3017.
20. Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007. Vol. 71. P. 1373–1386.
21. Sasaki J., Mizoue K., Morimoto S., Omura S. Microbial glycosylation of macrolide antibiotics by *Streptomyces hygroscopicus* ATCC31080 and distribution of a macrolide glycosyl transferase in several *Streptomyces* strains // J. Antibiot. 1996. Vol. 49. P. 1110–1118.
22. Shima J., Hesketh A., Okamoto S. et al. Induction of actinorhodin production by *rps L* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2) // J. Bacteriol. 1996. Vol. 178. P. 7276–7284.
23. Thompson J., Cundliffe E., Dahlberg A. E. Site-directed mutagenesis of *Escherichia coli* 23 S ribosomal RNA at position 1067 within the GTP hydrolysis centre // J. Mol. Biol. 1988. Vol. 203. P. 457–465.
24. Uchiyama H., Weisblum B. N-Methyl transferase of *Streptomyces erythraeus* that confers resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics: amino acid sequence and its homology to cognate R-factor enzymes from pathogenic bacilli and cocci // Gene. 1985. Vol. 38. P. 103–110.
25. Ueno M., Furukawa S., Abe F. et al. Suppressive effect of antibiotic siomycin on antibody production // J. Antibiot. 2004. Vol. 57. P. 590–596.
26. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification // Antimicrob. Ag. and Chemother. 1995. Vol. 39. P. 577–585.
27. Zhang H.-Z., Schmidt H., Piepersberg W. Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *ImrA* and *ImrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11 // Mol. Microbiol. 1992. Vol. 6. P. 2147–2157.

**THE CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTICS RESISTANCE FEATURES  
OF THIOPEPTIDE ANTIBIOTIC SIOMYCIN PRODUCER  
*STREPTOMYCES SIOYAENSIS* LV81**

**Y. Hrubsky, M. Lopatnuk, M. Myronovskyy, O. Gromyko,  
B. Ostash, V. Fedorenko**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua*

Resistance to antibiotics with different mechanisms of action was investigated for thiopeptide antibiotic producer *S. sioyaensis* Lv81. Wild type strain *S. sioyaensis* Lv81 has a natural resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics and polymyxin. *S. sioyaensis* Lv81 has a high resistance to thiostrepton, which structure is quite similar to siomycin, which belongs to thiopeptides antibiotics. But it has a high sensitivity to the low concentrations of rifampicin and streptomycin and is more sensitive to antibiotics of macrolides group, such as oleandomycin and erythromycin, than most investigated streptomycetes. The influence of different concentrations of streptomycin, rifampicin and erythromycin on spores survival of *S. sioyaensis* Lv81 has been investigated. Frequency of spontaneous streptomycin- and rifampicin-resistant mutants appearance set  $1 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-8}$ . Two groups of mutants are heterogenic by the antibiotics resistance level.

*Key words:* *S. sioyaensis*, siomycin, streptomycin-resistance, rifampicin-resistance.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИЗНАКОВ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ  
ПРОДУЦЕНТА ТИОПЕПТИДНОГО АНТИБИОТИКА СИОМИЦИНА  
*STREPTOMYCES SIOYAENSIS* LV81**

**Я. Грубский, М. Лопатнюк, М. Мироновский, А. Громько,  
Б. Осташ, В. Федоренко**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua*

Изучены признаки устойчивости продуцента тиопептидного антибиотика сиомицина *S. sioyaensis* Lv81 к антибиотикам различного механизма действия. Штамму дикого типа *S. sioyaensis* Lv81 присуща природная устойчивость к  $\beta$ -лактамам антибиотикам и полимиксину. *S. sioyaensis* Lv81 имеет высокий уровень устойчивости к тиострептон – ближайшему по структуре к сиомицину тиопептидному антибиотику. Однако он проявляет чувствительность к низким концентрациям рифампицина и стрептомицина, а также более чувствителен к макролидным антибиотикам – олеандомицину и эритромицину, чем большинство исследованных стрептомицетов. Изучено влияние различных концентраций стрептомицина, рифампицина и эритромицина на выживание спор *S. sioyaensis* Lv81. С частотой около  $1 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-8}$  возникают спонтанные стрептомицин- и рифампицин-устойчивые мутанты *S. sioyaensis* Lv81. Обе группы мутантов гетерогенны по уровню устойчивости к этим антибиотикам.

*Ключевые слова:* *S. sioyaensis*, сиомицин, стрептомицин-устойчивость, рифампицин-устойчивость.

Стаття надійшла до редколегії 14.04.10  
Надійшла після доопрацювання 30.07.10  
Прийнята до друку 21.09.10