

УДК 567.809.55

**ВПЛИВ УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ОПРОМІНЕННЯ НА АНТИБІОТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТА СІОМІЦИНУ *STREPTOMYCES SIOYAENSIS* Lv81**

**О. Аравіцька, Я. Грубський, М. Мироновський, О. Миколаїв,  
О. Громико, Б. Осташ, В. Федоренко**

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua*

Вивчено мінливість штаму *Streptomyces sioyaensis* Lv81 за рівнем синтезу тіопептидного антибіотика сіоміцину при вирощуванні на повноцінних живильних середовищах. Найвищу антибіотичну активність він має на соєвому середовищі. Досліджено вплив ультрафіолетового опромінення на виживання спор і антибіотичну активність штаму *S. sioyaensis* Lv81. Опромінення ультрафіолетом у дозі, що викликає падіння виживання спор до 0,2%, ефективне для відбору мутантів з підвищеним синтезом сіоміцину. Для порівняльного аналізу рівня біосинтезу сіоміцину вихідним штамом і його мутантами, а також пошуку клонів з підвищеною продукцією цього антибіотика доцільно використовувати метод, що ґрунтується на стимулюванні сіоміцином росту на середовищі з канаміцином штаму *Streptomyces lividans* TK24, який містить плазмиду pMO16 з геном канаміцин- і неоміцин-стійкості *neo* під контролем *tipA*-промотора.

*Ключові слова:* *Streptomyces sioyaensis*, сіоміцин, тіопептидні антибіотики, ультрафіолетове опромінення.

Штам *Streptomyces sioyaensis* Lv81(=NRRL-B5408) продукує комплекс тіопептидних антибіотиків, головним із яких є сіоміцин А. Сіоміцин і найближчий до нього за структурою тіострептон володіють низкою дуже важливих біологічних активностей. Вони блокують білковий синтез у бактерій, зв'язуючись із комплексом рибосомного білка L11 і 23S рРНК. Крім того, вони діють як імуносупресанти і протипухлинні агенти, а також здатні пригнічувати розвиток збудника малярії *Plasmodium falciparum* [3, 5, 9, 12]. Хоча тіопептиди відкриті ще у 50-х роках ХХ ст., вони мали тільки обмежене застосування у ветеринарній медицині, що спричинене головню їхньою низькою розчинністю у воді.

Зростаюча потреба у нових антибактерійних і протипухлинних агентах, зумовлена насамперед розповсюдженням резистентності збудників інфекцій і ракових клітин до широкоживаних антибіотиків, знову привертає велику увагу дослідників до тіопептидів, зокрема до тіострептону і сіоміцину. Однак механізм біосинтезу цих антибіотиків, його генетичний контроль, а також генетичні особливості актиноміцетів, які їх продукують, вивчені недостатньо. Лише нещодавно клоновано кластери генів біосинтезу цих антибіотиків і доведено, що їхній пептидний попередник синтезується на рибосомах, і зроблено перші кроки у напрямі створення ефективної системи клонування генів у *S. sioyaensis* [8, 10]. Для з'ясування генетичного контролю біосинтезу сіоміцину та отримання його біотехнологічних продуцентів треба опрацювати систему селекції мутантів *S. sioyaensis*. Штами актиноміцетів дикого типу зазвичай синтезують дуже незначні кількості антибіотичних сполук, тому необхідно проводити відбір клонів із підвищеним рівнем синтезу антибіотика. Це завдання є актуальним і для *S. sioyaensis*.

Метою нашої роботи є опрацювання системи селекції мутантів *S. sioyaensis* зі зміненою здатністю до біосинтезу SiA з використанням як мутагену ультрафіолетового випромінювання (УФ). Для виконання цього завдання ми дослідили спонтанну мінливість *S. sioyaensis* за рівнем антибіотичної активності на різних поживних середовищах і вивчили вплив УФ на виживання спор штаму та біосинтез сіоміцину.

У роботі використано штами *S. sioyaensis* Lv81(=NRRL-B5408), *S. globisporus* 1912-2 (продуцент ландоміцину E) та *S. nogalater* IMET 43360 (продуцент ноґаламіцину) з Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків ЛНУ імені Івана Франка, та похідні *S. sioyaensis*, отримані у цій роботі. Як тест-культури для визначення антибіотичної активності *S. sioyaensis* використали штами *Sarcina lutea* та *Bacillus cereus*. Для аналізу біосинтезу сіоміцину використали також штам *Streptomyces lividans* ТК24, який містить плазмиду рМО16.

Штами *S. sioyaensis* вирощували при температурі 28°C на таких середовищах: вівсяному (BC; овес мелений – 40 г, кукурудзяне борошно – 20 г, NaCl – 5 г, глюкоза – 10 г, агар – 15 г, вода водопровідна – до 1 л); соєвому №14 (CC-14; соєве борошно – 20 г, NaCl – 5 г, глюкоза – 10 г, агар – 15 г, вода водопровідна – до 1 л); кукурудзяному №7 (KC-7; кукурудзяне борошно – 20 г, NaCl – 5 г, глюкоза – 10 г, агар – 15 г, вода водопровідна – до 1 л); середовищі Беннета (пептон – 1 г, дріжджовий екстракт – 1 г, триптон – 2 г, глюкоза 10 г, агар – 20 г, вода дистильована – до 1 л). Штам *Streptomyces lividans* ТК24 (рМО16) вирощували при температурі 28°C на BC, а *Sarcina lutea* та *Bacillus cereus* на триптозному агарі [7] при температурі 37°C.

Антибіотичну активність штаму *S. sioyaensis* визначали методом дифузії в агар за пригніченням росту тест-культур [2]. Визначали індекси продуктивності (ІП) окремих клонів культури [11].

Для порівняльного аналізу рівня біосинтезу сіоміцину вихідним штамом та його мутантами застосували також тест-систему *S. lividans* ТК24 (рМО16). Для визначення антибіотичної активності з використанням цієї системи штами *S. sioyaensis* вирощували в середовищі SG [7] протягом 7 діб при температурі 28°C. Сіоміцини екстрагували з 2 мл культури. Її центрифугували 1 хв при 13000 об/хв, супернатант зливали, осад двічі промивали дистильованою водою та осад ресуспендували в 300 мкл диметилсульфоксиду (тривалість екстракції 90 хв). Екстракти центрифугували 1 хв при 13000 об/хв. На паперові диски наносили по 10 мкл екстракту, а також розчинника (контроль). Диски сушили 60 хв при температурі 37°C та накладали на поверхню середовища з канаміцином (50 мкг/мл), попередньо засіяного газоном *S. lividans* ТК24 рМО16. Чашки інкубували протягом трьох діб при 28°C та вимірювали зони росту *S. lividans* ТК24 (рМО16) навколо дисків з екстрактами. При цьому враховували вагу біомаси *S. sioyaensis*, з якої проводили екстракцію сіоміцину.

Тонкошарову хроматографію (ТШХ) екстрактів, отриманих з біомаси *S. sioyaensis*, проводили в системі розчинників хлороформ:метанол (10:1) на пластинках Silufol. Після проведення ТШХ пластинки заливали 0,7% агаризованим середовищем LB [7] з додаванням тест-культур. Пластинки інкубували 12 год при 28°C. Зони пригнічення росту тест-культур навколо ділянок хроматограми зі сіоміцином спостерігали у видимому світлі.

Спори штаму *S. sioyaensis* опромінювали ультрафіолетовими променями (УФ-променями) з довжиною хвилі 260–280 нм. Джерелом УФ-променів служила лампа Medicor BLM-12. Потужність лампи – 15 Вт, віддаль від лампи до поверхні суспензії спор – 16 см.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Origin50.

Для кількісного визначення рівня продукції сіоміцину штамом *S. sioyaensis* підібрано оптимальну тест-культуру. Оскільки сіоміцини активні проти грамполозитивних бактерій, то дослідили можливість використання *Sarcina lutea* та *B. cereus* для виявлення антибіотичної активності *S. sioyaensis*. Культура *S. lutea* була більш чутливою до дії сіоміцину, тому в подальших експериментах саме її використали як тест-культуру.

Відомо, що рівень антибіотичної активності актиноміцетів залежить від складу живильних середовищ, на яких їх вирощують [1, 2]. Підбір середовища, оптимального для росту й антибіотичної активності *S. sioyaensis* був наступним етапом нашої роботи. Вивчено ріст і антибіотичну активність штаму на чотирьох повноцінних живильних середовищах: ВС, КС-7, СС-14, середовищі Беннета. Не спостерігали суттєвих відмін за нагромадженням біомаси *S. sioyaensis* на вказаних середовищах, однак для отримання високого титру спор культуру вирощували на ВС. Найвище середнє значення антибіотичної активності мали клони, які утворилися на середовищах СС-14 (середній ІІ становив  $5,30 \pm 0,10$ ) і ВС (середній ІІ –  $4,50 \pm 0,08$ ) (табл. 1). Клони, що виростили на середовищах ВС, КС-7 і СС-14 більш мінливі за рівнем антибіотичної активності (коефіцієнт варіації CV близько 39%), ніж клони зі середовища Беннета (CV=24,9%). Частка «плюс»-варіантів з рівнем антибіотичної активності, вищим від  $\bar{X} + 2\sigma$ , які вважаються найбільш цінними у селекційному сенсі [1], варіювала у межах 4,5–5,8% та була найвищою серед клонів зі середовища СС-14. Врахувавши отримані дані, а також вартість інгредієнтів живильних середовищ, ми дійшли висновку, що слід надати перевагу середовищу СС-14 для використання у подальших експериментах зі селекції *S. sioyaensis*. Клони, вирощені на ньому, мали найвищий середній рівень антибіотичної активності та відносно високу мінливість за рівнем синтезу сіоміцину. Серед них було й відносно багато «плюс»-варіантів.

Ми дослідили вплив різних доз УФ на життєздатність спор *S. sioyaensis* та порівняли його з іншими стрептоміцетами – *S. nogalater* ІМЕТ43360, продуцентом антрациклінового антибіотика ногаламіцину та *Streptomyces globisporus* 1912-2, продуцентом ангуциклінового антибіотика ландоміцину Е, за чутливістю до цього мутагену (рис. 1).

Спори *S. sioyaensis* опромінювали УФ протягом 10–150 с. Опромінення спор штаму протягом 10 с спричинило зниження їх виживання удвічі, а протягом 40 с – більш ніж на 90%. Летальна дія УФ зростала зі збільшенням часу опромінення. Після 90 с опромінення виживало близько 1,3% спор, а після 150 с – 0,03%. Коли дія УФ тривала 10–60 с, то найстійкішим до дії мутагену був *S. nogalater*. Однак збільшення часу опромінення до 90 с і більше знижувало виживання його спор до рівня, властивого *S.*

Таблиця 1

Антибіотична активність штаму *S. sioyaensis* Lv81 на різних живильних середовищах

Середовища та їх склад	Показники				
	Кількість клонів, N	Середнє значення ІІ, (M±m)	Частка «плюс»-варіантів, %	Частка «мінус»-варіантів, %	Коефіцієнт варіації, CV, %
ВС	343	4,50±0,08	4,5	1,4	39,8
КС-7	348	3,31±0,07	4,6	4,0	39,4
СС-14	383	5,30±0,10	5,8	2,0	39,2
Беннет	367	3,22±0,04	5,7	0,3	24,9

*sioyaensis*. Характер кривої *S. globisporus* свідчить про те, що він значно чутливіший до дії УФ, ніж *S. sioyaensis* і *S. nogalater*.

Відомо, що УФ виявляє найбільший мутагенний ефект у дозах, при яких виживання клітин становить від 0,1 до 1,0% [1, 4]. Тому при вивченні впливу УФ на антибіотичну активність *S. sioyaensis* (табл. 2) використано час опромінення 90 і 120 с. За цих доз виживання спор штаму становило близько 1,2 та 0,2% відповідно. Опромінення УФ протягом 90 с дещо знижувало середній ІП досліджуваних клонів (на 2%). Натомість зростання дози до 120 с зумовило підвищення на 17,3% середнього ІП клонів, отриманих з УФ-опромінених спор, порівняно з вихідним штамом. Серед них виявили й найбільше «плюс»-варіантів – 15,3% проти 4,5% у вихідного штаму. Порівняно з вихідним штамом коефіцієнт варіації за ознакою антибіотичної активності зріс майже на 5% після 120 с опромінення та на 10% після 90 с.

Виділено 40 УФ-індукованих та «плюс»-варіантів (17 після опромінення протягом 90 с і 33 – після 120 с). Їх порівняли за ІП з такою ж за чисельністю вибіркою спонтанних «плюс»-варіантів вихідного штаму. Як серед спонтанних, так і серед УФ-індукованих «плюс»-варіантів переважають клони з відносно найнижчими ІП – від 9,8 до 12,0. Їх частка варіює у цих вибірках від 78 до 99%. Серед спонтанних «плюс»-варіантів виявлено 6% таких, що мали відносно найвищі ІП (13,0–16,0). Після УФ-опромінення протягом 120 с (виживання спор 0,2%) отримано значно більше (21%) «плюс»-варіантів з такими ІП. Натомість при меншій дозі УФ (90 с) не вдалося виділити клони з найвищими ІП. Ці дані свідчать про те, що існує досить вузький діапазон доз УФ, за яких слід вести відбір клонів *S. sioyaensis* Lv81 з підвищеним синтезом сіоміцину.

Досліджено можливість використання у селекції *S. sioyaensis* тест-системи *S. lividans* ТК24 (рМО16). Ця система ґрунтується на властивості тіопептидних антибіотиків індукувати експресію генів, що перебувають під контролем промотора гена *tipA*. У при-

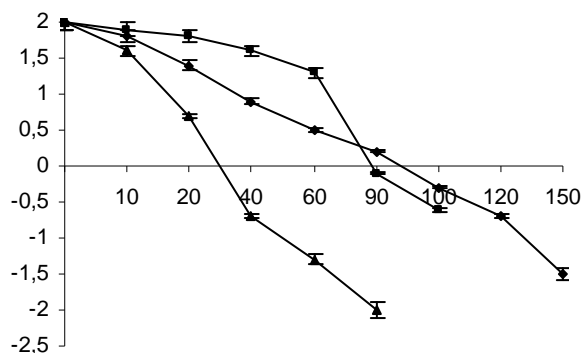


Рис. 1. Залежність виживання спор штаму *S. nogalater* IMET 43360 (а), *S. sioyaensis* Lv81 (б) і *S. globisporus* 1912-2 (в) від часу УФ-опромінення. За віссю абсцисс – час опромінення, с; за віссю ординат – lg виживання спор, %.

Таблиця 2

Вплив УФ-опромінення спор на антибіотичну активність *S. sioyaensis* Lv81

Час обробки спор, с	Кількість клонів, %	Середнє значення ІП, %	Частка «плюс»-варіантів, %	Частка «мінус»-варіантів, %	Коефіцієнт варіації, CV, %
Контроль	395	100*	4,5	1,4	39,8
90	181	98,0±0,3	9,3	4,9	49,0
120	215	117,3±0,5	15,3	0	44,1

Примітка. \* – за 100% приймали середнє значення ІП спонтанних клонів штаму *S. sioyaensis* Lv81.

сутності тіопептидів білок TipAL набуває здатності зв'язуватися з промоторами різних генів, включно з власним, і активувати їхню експресію [6]. Плазміда pMO16 містить ген *neo*, що забезпечує стійкість до канаміцину та неоміцину, злитий з промотором *ptipA*. За присутності сіоміцинів у середовищі штам *S. lividans* ТК24 (pMO16) набуває стійкості до канаміцину і неоміцину та росте на середовищі з цими антибіотиками. Розміри зон росту зростають зі збільшенням кількості тіопептидів в екстрактах, нанесених на диски.

Ми порівняли вихідний штам *S. sioyaensis* Lv81 та 23 УФ-індукованих «плюс»-варіантів за здатністю пригнічувати ріст тест-культури *Sarcina lutea* і стимулювати ріст *S. lividans* ТК24 (pMO16). На диски наносили однакові кількості екстрактів із культур досліджуваних штамів і накладали їх на поверхню середовищ, засіяних газонами *Sarcina lutea* та *S. lividans* ТК24 (pMO16). Виявили, що зони пригнічення росту *Sarcina lutea* навколо дисків з екстрактами мутантних штамів на 8–10% ширші, ніж у вихідного штаму. У той же час зони росту *S. lividans* ТК24 (pMO16) навколо дисків з екстрактами тих самих штамів на 20–40% більші, ніж у вихідного штаму. Це свідчить про те, що метод з використанням *S. lividans* ТК24 (pMO16) для пошуку штамів з підвищеним синтезом сіоміцину має вищу чутливість порівняно із застосуванням методу пригнічення росту тест-культури *Sarcina lutea*. На рис. 2 наведено приклад порівняння зон стимуляції росту *S. lividans* ТК24 (pMO16) екстрактами, виділеними з вихідного штаму, та його УФ-індукованого мутанта Suv92. Зона росту тест-штаму навколо диска з екстрактом цього мутанта перевищує таку ж зону росту навколо контрольного диска у середньому на 30%.

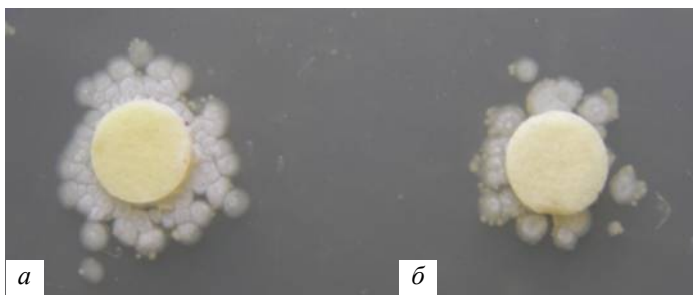


Рис. 2. Зони росту *S. lividans* ТК24 (pMO16) навколо дисків з екстрактами УФ-індукованого мутанта Suv92 (а) і вихідного штаму *S. sioyaensis* Lv81 (б).

Дані, отримані в роботі, дають змогу визначити кілька основних підходів до селекції штаму *S. sioyaensis* Lv81, спрямованої на підвищення рівня синтезу сіоміцину. З отриманих результатів випливає, що оптимальним для селекційних робіт є вирощування штаму на повноцінному живильному середовищі СС-14 на основі соєвого борошна. УФ-опромінення *S. sioyaensis* Lv81 у дозі, що знижує виживання спор до близько 0,2%, є ефективним способом отримання клонів культури з підвищеним рівнем синтезу сіоміцину. Вперше доведено, що для пошуку штамів з підвищеною продукцією сіоміцину можна використати метод, заснований на стимулюванні сіоміцином росту штаму *S. lividans* ТК24, який містить плазміду pMO16 з геном канаміцин- і неоміцин-стійкості *neo* під контролем *tipA*-промотора.

1. Громико О. М., Федоренко В. О. Вплив мутагенів на антибіотичну активність *Streptomyces nogalater* IMET43360 – продуцента протипухлинного антибіотика ногаламіцину // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2005. Вип. 40. С. 16–22.
2. Жукова Р. А., Коммунарская А. Д., Пронина М. И. и др. Методы селекции продуцентом антибиотиков и ферментов. Л.: Медицина, 1978. 160 с.

3. Bagley M. C., Dale J. W., Merritt E. A., Xiong X. Thiopeptide antibiotics // Chem. Rev. 2005. Vol. 105. P. 685–714.
4. Baltz R. Mutation in *Streptomyces* // The bacteria. The treatise on structure and function. Vol. IX. Antibiotic-producing *Streptomyces* / Ed. by S.W. Qbeener, E. Day. Orlando: Academic Press, Inc. 1986. P. 61–94.
5. Bhat U. G., Zipfel P. A., Tyler D. S., Gartel A. L. Novel anticancer compounds induce apoptosis in melanoma cells // Cell Cycle. 2008. Vol. 7. P. 1851–1855.
6. Holmes D., Caso J., Thompson C. Autogenous transcriptional activation of a thiostrepton-induced gene in *Streptomyces lividans* // EMBO. J. 1993. Vol. 12. P. 3183–3191.
7. Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater K., Hopwood D. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, England: John Innes Foundation. 2000. 634 p.
8. 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.
9. McConkey G. A., Rogers M. J., McCutchan T. F. Inhibition of *Plasmodium falciparum* protein synthesis // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 2046–2049.
10. Myronovskyy M., Ostash B., Ostash I., Fedorenko V. A gene cloning system for the siomycin producer *Streptomyces sioyaensis* NRRL-B5408 // Folia Microbiol. 2009. Vol. 54. P. 91–96.
11. Trilli A., Costanzi I., Lamanna F., DiDio N. Development of agar disc method for the rapid screening of strains with increased productivity // J. Chem. Technol. Biotechnol. 1982. Vol. 32. P. 281–291.
12. Ueno M., Furukawa S., Abe F. et al. Suppressive effect of antibiotic siomycin on antibody production // J. Antibiot. 2004. Vol. 57. P. 590–596.

#### ULTRAVIOLET IRRADIATION INFLUENCE ON ANTIBIOTICAL ACTIVITY OF *STREPTOMYCES SIOYAENSIS* LV81

O. Aravitska, Y. Grubskyy, M. Myronovskyy, O. Mykolayiv,  
O. Gromyko, B. Ostash, V. Fedorenko

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

The variability of thiopeptide antibiotic siomycin production by *S. sioyaensis* Lv81 was studied under conditions of growth on replete media. Soy medium gave the highest antibiotic activity. Influence of ultraviolet irradiation on spore survival and antibiotic activity of *S. sioyaensis* Lv81 has been explored. UV dose that leads to 0,2% survival is efficient to screen for mutants with increased siomycin production. Reporter strain *S. lividans* TK24 pMO16 (carries transcriptional fusion of kanamycin resistance gene neo to promoter tip Ap) can be used to compare the siomycin production different *S. sioyaensis* clones. The comparative analysis is based on differential stimulation with siomycin of growth of the reporter strain on kanamycin – containing agar plates.

**Key words:** *Streptomyces sioyaensis*, siomycin, thiopeptide antibiotic, ultraviolet irradiation.

**ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА  
АНТИБИОТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОДУЦЕНТА СИОМИЦИНА  
*STREPTOMYCES SIOYAENSIS* LV81**

**А. Аравицкая, Я. Грубский, М. Мироновский, О. Мыколаив,  
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*

Изучена изменчивость культуры *Streptomyces sioyaensis* Lv81 по уровню синтеза тиопептидного антибиотика сиомицина при выращивании на полноценных питательных средах. Самую высокую антибиотическую активность он имеет на соевой среде. Исследовано влияние ультрафиолетового облучения на выживание спор и антибиотическую активность штамма *S. sioyaensis* Lv81. Облучение ультрафиолетом в дозе, вызывающей снижение выживания спор до 0,2%, является эффективным для отбора мутантов с повышенным синтезом сиомицина. Для сравнительного анализа уровня биосинтеза сиомицина исходным штаммом и его мутантами, а также для поиска клонов с повышенной продукцией этого антибиотика целесообразно использовать метод, основанный на стимулировании сиомицином роста на среде с канамицином штамма *Streptomyces lividans* TK24, несущего плазмиду pMO16 с геном канамицин- и неомицин-устойчивости *neo* под контролем *tipA*-промотора.

*Ключевые слова:* *Streptomyces sioyaensis*, сиомицин, тиопептидные антибиотики, ультрафиолетовое облучение.

Стаття надійшла до редколегії 16.02.09

Прийнята до друку 18.05.09