



УДК 567.809.55

АНТИБІОТИЧНА АКТИВНІСТЬ ШТАМУ *STREPTOMYCES ECHINATUS* DSM40730 ЗА УМОВ ВПЛИВУ УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ОПРОМІНЕННЯ

Д. О. Климишин

Інститут біології тварин НААН України, вул. Стуса, 38, Львів 79034, Україна
e-mail: dedima@rambler.ru

Досліджено вплив ультрафіолетового опромінення на виживання й антибіотичну активність продуцента аранціаміцину *S. echinatus* DSM40730. Оптимальною дозою для виділення мутантів цього штаму є опромінення протягом 130 с, за якого виживає 0,7% спор. Підібрано середовище для максимального спороутворення та нагромадження аранціаміцину штамом *S. echinatus*. Для визначення антибіотичної активності продуцента аранціаміцину доцільним є використання *Sarcina lutea* як тест-культури.

Ключові слова: антрациклінові антибіотики, аранціаміцин, *Streptomyces echinatus*, ультрафіолетове опромінення.

ВСТУП

На сьогодні актиноміцети є одними з найважливіших об'єктів сучасної генетики та промислової біотехнології [5, 7–9]. Дві третини антибіотиків є метаболітами актиноміцетів, 80% із яких синтезують представники роду *Streptomyces* [5]. Ці бактерії активно вивчаються на предмет генетичного контролю біосинтезу протипухлинних антибіотиків, що сприяє активному розвитку методів генетичної інженерії та селекції їхніх продуцентів [5, 7].

Серед сполук, які синтезуються актиноміцетами, найінтенсивніше вивчаються антибіотики, що належать до класу антрациклінів. Їм властива антибактерійна, а також цитостатична і цитотоксична дія на пухлинні клітини ссавців, що і зумовлює підвищений інтерес до цих сполук [7, 8].

Streptomyces echinatus DSM40730 є продуцентом антрациклінового антибіотика аранціаміцину (рис. 1). Похідні аранціаміцину нині успішно застосовуються як самостійно, так і у комплексі з іншими препаратами для

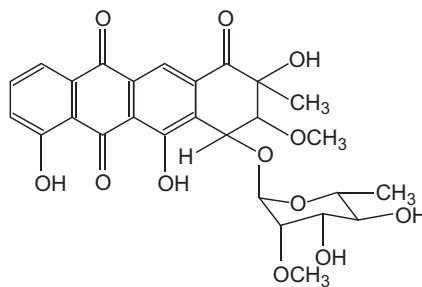


Рис. 1. Будова молекули аранціаміцину
Fig. 1. Structure of aranciamycin

терапії зляжкісних новоутворень [4, 6, 10]. З огляду на клінічний успіх аранціаміцинів невпинно зростає потреба у промислових продуцентах цих сполук. Метою роботи було дослідження впливу ультрафіолетового випромінювання (УФ) на виживання й антибіотичну активність штаму *S. echinatus*. Очікується, що успішне використання цього мутагена дасть змогу одержувати штами з підвищеним рівнем синтезу аранціаміцину.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використано штам *Streptomyces echinatus* DSM40730 – продуцент аранціаміцину дикого типу та його похідні, отримані у цій роботі. Як тест-культури для визначення антибіотичної активності *S. echinatus* DSM40730 використали штами *Escherichia coli* DH5 α , *Sarcina lutea* KA37 та *Bacillus cereus* ATCC 19637.

Штами *S. echinatus* вирощували за температури 28°C на таких середовищах: вівсяному (BC; овес мелений – 50 г, агар – 15 г, вода водопровідна – до 1 л); соєвому (CC-14; соєве борошно – 20 г, NaCl – 5 г, глюкоза – 10 г, агар – 15 г, вода водопровідна – до 1 л); кукурудзяному (KC-7; кукурудзяне борошно – 25 г, NaCl – 5 г, глюкоза – 10 г, агар – 15 г, вода водопровідна – до 1 л); мінімальному середовищі Хопвуда (MC) [9]. Штами *S. lutea*, *E. coli* та *B. cereus* – на LA [5] за температури 37°C.

Для екстракції аранціаміцину штам *S. echinatus* DSM40730 вирощували на середовищах BC, KC-7 та CC-14 протягом шести діб за температури 37°C. Антибіотик екстрагували хлороформом (5 мл), випаровували до сухого стану і розчиняли в 300 мкл метанолу. На паперові диски (d диска становить 5 мм) наносили по 30 мкл екстрактів і розчинник (контроль). Диски сушили 60 хв за температури 37°C та накладали на середовище з *S. lutea*. Антибіотичну активність штаму *S. echinatus* DSM40730 визначали методом дифузії в агар з пригніченням росту тест-культури. Індекси продуктивності (ІП) визначали для окремих клонів культури.

Спори штаму *S. echinatus* опромінювали ультрафіолетовими променями (УФ-променями) з довжиною хвилі 260–280 нм, віддаль від лампи до поверхні суспензії спор – 20 см.

Статистичну обробку одержаних даних проводили за допомогою програми Origin 50.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Підібрано низку середовищ для отримання високого титру спор і нагромадження аранціаміцину штамом *S. echinatus* DSM40730. Для цього у роботі використано повноцінні середовища: BC, KC-7, CC-14, а також мінімальне середовище MC. Ці середовища найчастіше використовуються для культивування штамів актиноміцетів у лабораторних умовах [5, 9]. Виявилось, що найвищий титр спор спостерігається при вирощуванні *S. echinatus* на MC і BC та в середньому становить $(4,2 \pm 0,5) \times 10^9$. Натомість на середовищі KC-7 та CC-14 *S. echinatus* характеризувався слабким розвитком повітряного міцелію та низьким титром спор $(7,4 \pm 0,3) \times 10^5$.

Досліджено антибіотичну активність штаму *S. echinatus* на використаних у роботі середовищах. Так, при вирощуванні *S. echinatus* на KC-14 і CC-7 антибіотична активність штаму становить $24 \pm 0,2$, а на BC – $32 \pm 0,2$ (рис. 2). З огляду на одержані результати у подальшій роботі ми використали BC для культивування продуцента аранціаміцину з метою накопичення цього антибіотика й отримання спор.

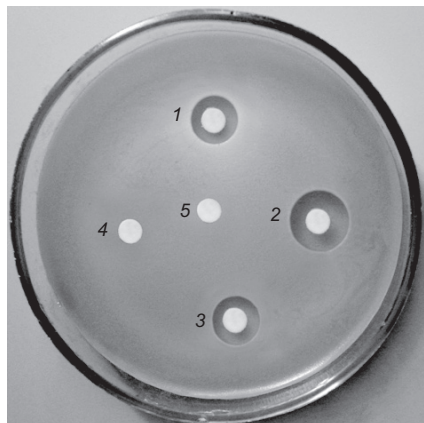


Рис. 2. Антибіотична активність штаму *S. echinatus* DSM40730 за умов його вирощування: 1 – на КС; 2 – на ВС; 3 – на СС; 4 – на МСХ; 5 – контроль (висушений диск, на який попередньо наносили метанол). Тест-культура – *S. lutea*

Fig. 2. Antibiotic activity of *S. echinatus* DSM40730 cultured: 1 – on corn medium; 2 – on oat medium; 3 – on soy medium; 4 – on minimal medium; 5 – control (dried methanol). Test culture – *S. lutea*

Для визначення рівня синтезу аранціаміцину штамом *S. echinatus* підібрано оптимальну тест-культуру. З цією метою використано *S. lutea*, *E. coli* та *B. cereus*. Ці тест-культури найчастіше використовують для визначення рівня синтезу антрациклінових антибіотиків стрептоміцетами [5]. Виявилось, що культури бактерій *E. coli* та *B. cereus* є стійкими до екстрактів антибіотиків, отриманих з *S. echinatus*. Культура *S. lutea* виявилася чутливою до цих екстрактів, що дає змогу успішно використовувати її для подальших маніпуляцій із *S. echinatus*.

Чутливість штамів актиноміцетів щодо дії УФ може змінюватись у ході селекції [1–3, 5]. Тому в роботі з різними видами застосовуються різні дози УФ для досягнення потрібного летального і мутагенного ефекту. Оскільки сьогодні відсутні дані щодо впливу УФ на *S. echinatus*, ми використали різні дози мутагена та дослідили їхній вплив на виживання спор і антибіотичну активність цього штаму. Спори продуцента аранціаміцину опромінювали протягом 10–180 с. Виявлено, що опромінення спор *S. echinatus* протягом 30 с спричиняло зниження їхнього виживання на 50%, а протягом 80 с – більш ніж на 90%. Також летальна дія УФ зростала зі збільшенням часу опромінення (рис. 3). Зокрема, після опромінення культури протягом

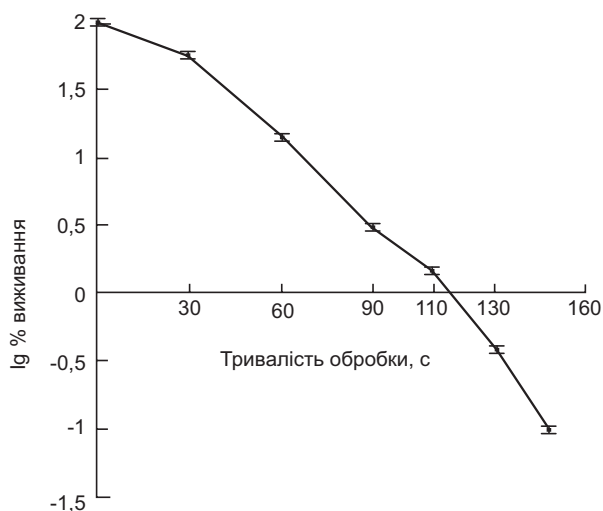


Рис. 3. Вплив УФ на виживання спор штаму *S. echinatus* DSM40730

Fig. 3. The influence of UV on the *S. echinatus* DSM40730 spores survival

110 с виживало близько 1,7%, а після 130 с – 0,7% спор. Подальше збільшення часу опромінення культури призводило до повної загибелі спор продуцента аранціаміцину. Використання доз 90 с та 110 с опромінення знижувало середнє значення ІП порівняно з вихідним штамом (див. таблицю). За умов опромінення спор *S. echinatus* протягом 130 с середнє значення ІП зростало до 10%, а частка „плюс”-варіантів – до 9%. Порівняно з вихідним штамом коефіцієнт варіації за ознакою антибіотичної активності зріс на 7% після 130 с, на 12% – після 110 с та на 15% – після 90 с опромінення.

Вплив УФ-опромінення на антибіотичну активність *S. echinatus* DSM40730
The influence of UV-irradiation on antibiotic activity of *S. echinatus* DSM40730

Тривалість обробки спор, с	Кількість клонів	Середнє значення ІП, %	Частка „плюс”-варіантів, %	Частка „мінус”-варіантів, %	Коефіцієнт варіації, CV, %
Контроль	286	100	3,1	1,4	32,4
90	188	94,0±0,2	2,7	1,1	45,0
110	260	95,8±0,5	7,8	4,2	44,2
130	213	110,0±0,7	12,0	6,4	40,7

Відомо, що УФ виявляє найбільший мутагенний ефект у дозах, за яких виживання клітин становить від 0,1 до 1,0% [1–3, 5], тому в подальшому ми обробляли спори *S. echinatus* протягом 130 с. У результаті обробки спор *S. echinatus* УФ за таких умов відібрано 23 УФ-індукованих „плюс”-варіанти та проведено порівняння середніх значень ІП екстрактів антибіотиків із одержаних штамів. Для цього їх порівняли за значенням ІП з такою ж за чисельністю вибіркою спонтанних „плюс”-варіантів вихідного штаму. Показано, що серед одержаних УФ-індукованих „плюс”-варіантів переважають клони зі середнім значенням ІП 1,9–2,2. Найвищою антибіотичною активністю характеризувався один УФ-індукований мутант, названий SEU 16, відібраний для подальших досліджень. Антибіотична активність SEU 16 в середньому на 12% вища, ніж у штаму дикого типу *S. echinatus* DSM40730 (рис. 4).

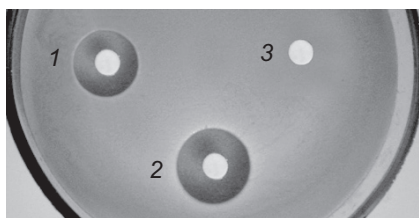


Рис. 4. Антибіотична активність штамів: 1 – *S. echinatus* DSM40730; 2 – *S. echinatus* SEU 16; 3 – метанол. Тест-культура – *S. lutea*

Fig. 4. Antibiotic activity of: 1 – *S. echinatus* DSM40730; 2 – *S. echinatus* SEU 16; 3 – dried methanol. Test culture – *S. lutea*

ВИСНОВКИ

Отже, оптимальним середовищем для отримання високого титру спор і нагромадження аранціаміцину штамом *S. echinatus* DSM40730 є ВС. При вирощуванні *S. echinatus* на цьому середовищі титр спор становив $(4,2 \pm 0,5) \times 10^9$, а середнє значення ІП – $1,7 \pm 0,2$. Для дослідження рівня синтезу аранціаміцину доцільним є використання *S. lutea* як тест-культури. Штами *E. coli* та *B. cereus* є стійкими до досліджуваного антибіотика. Обробка *S. echinatus* DSM40730 УФ протягом 130 с є ефективним способом отримання клонів культури з підвищеним рівнем синтезу аранціаміцину.

Автор висловлює подяку професорові В. О. Федоренку за люб'язно надані штами *E. coli*, *B. cereus* та *S. echinatus*, що були використані у роботі.

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; 50: 11–17.
2. 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; 40: 16–22.
3. Грубський Я., Аравіцька О., Мироновський М. та ін. Вплив N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину та N-метил-N-нітрозометилсечовини на антибіотичну активність продуцента сіоміцину *Streptomyces sioyaensis* LV81. **Мікробіологія і біотехнологія**, 2009; 6: 28–35.
4. Климишин Д., Лужецький А., Громико О. та ін. Клонування та гетерологічна експресія генів O-метилтрансфераз *Streptomyces nogalater* IMET 43360, задіяних у біосинтезі ногаламіцину. **Вісн. Укр. тов. генетиків і селекціонерів**, 2008; 6(2): 224–232.
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. Bols M., Binderup L., Hansen J., Rasmussen P. Inhibition of collagenase by aranciamycin and aranciamycin derivatives. **J. Med. Chem.**, 1992; 35: 2768–2771.
7. Demain A.L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **J. Antibiot.**, 2009; 62: 5–16.
8. Hopwood D.A. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. **Microbiol.**, 1999; 145: 2183–2202.
9. Kieser T., Bibb M., Buttner M. et al. **Practical Streptomyces genetics**. Norwich, England: John Innes Foundation, 2000. 634 p.
10. Luzhetskyy A., Almuth M., Hoffmann J., Pelzer S. Cloning and Heterologous Expression of the Aranciamycin Biosynthetic Gene Cluster Revealed a New Flexible Glycosyltransferase. **Chem. Bio. Chem.**, 2008; 8: 599–602

THE INFLUENCE OF ULTRAVIOLET IRRADIATION ON THE ANTIBIOTIC ACTIVITY OF ARANCIAMYCIN PRODUCER STRAIN *STREPTOMYCES ECHINATUS* DSM40730

D. O. Klymyshin

Institute of Animal Biology, 38, Stoops St., 38, Lviv 79034, Ukraine
e-mail: dedima@rambler.ru

The influence of ultraviolet irradiation on spore survival and antibiotic activity of aranciamycin producer strain *S. echinatus* DSM40730 was investigated. Optimal medium for aranciamycin production and *S. echinatus* sporulation was selected. Optimal UV dose that leads to 0,7% of *S. echinatus* spores survival is efficient for screening of aranciamycin overproducers. For determination of the antibiotic activity of *S. echinatus* strain *Sarcina lutea* was used.

Key words: *Streptomyces echinatus*, aranciamycin, ultraviolet irradiation, anthracycline antibiotics.

АНТИБИОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММА *STREPTOMYCES ECHINATUS* DSM40730 В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**Д. А. Климишин**

Институт биологии животных НААН Украины, ул. Стуса, 38, Львов 79034, Украина

e-mail: dedima@rambler.ru

Было исследовано влияние ультрафиолетового облучения на выживание и антибиотическую активность продуцента аранциамицина *S. echinatus* DSM40730. Оптимальной дозой для выделения мутантов этого штамма является облучение в течение 130 с, при которой выживает 0,7% спор. Подобрана среда для максимального спорообразования и накопления аранциамицина штаммом *S. echinatus*. Для определения антибиотической активности продуцента аранциамицина целесообразным является использование *Sarcina lutea* как тест-культуры.

Ключевые слова: *Streptomyces echinatus*, аранциамицин, ультрафиолетовое облучение, антрациклиновые антибиотики.

Одержано: 13.09.2010